

Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

**Toxický účinek nanostrukturovaných materiálů na bázi  
oxidu zinečnatého**

**Nanostructured materials on the base of zinc oxide and  
their toxic effect**

Student:

**Julie Smijová**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Karla Čech Barabaszová, Ph.D.**

Ostrava 2017

## Zadání bakalářské práce

Student:

**Julie Smijová**

Studijní program:

B3942 Nanotechnologie

Studijní obor:

3942R001 Nanotechnologie

Téma:

Toxický účinek nanostrukturovaných materiálů na bázi oxidu  
zinečnatého  
Nanostructured materials on the base of zinc oxide and their toxic effect

Jazyk vypracování:

čeština

Zásady pro vypracování:

Cílem bakalářské práce je sledování schopnosti, získaných a připravených nanostrukturovaných materiálů na bázi oxidu zinečnatého, indukovat peroxidaci lipidů, která je jedním z markerů oxidativního stresu (resp. toxicity materiálů).

Teoretická část bakalářské práce bude řešena formou literární rešerše na téma: nanočástice oxidu zinečnatého, antibakteriální vlastnosti oxidu zinečnatého, toxické vlastnosti oxidu zinečnatého a jeho schopnost indukovat oxidativní stres. Vliv toxicity oxidu zinečnatého na lidský organismus - životní cyklus.

V rámci experimentální části budou (a) komerčně získaný oxid zinečnatý, mechanochemicky připravené (b) velikostně definované částice oxidu zinečnatého a (c) částice nanokompozitů oxid zinečnatý/vermikulit podrobeny strukturní a fázové charakterizaci. Provedené charakterizace experimentálních vzorků poslouží k interpretaci a vyhodnocení toxického účinku (schopnosti indukovat peroxidaci lipidů) na modelové molekule kyseliny linolové.

Seznam doporučené odborné literatury:

Y.N. Chang, M. Zhang, L. Xia, J. Zhang and G. Xing. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. Materials 5, 2012, 2850-2871.

Q. Xiao, S. Huang, J. Zhang, Ch. Xiao and X. Tan. Sonochemical synthesis of ZnO nanosheet. Letter. Journal of Alloys and Compounds 459, 2008, L18-L22.

I.L. Hsiao and Y.J. Huang. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. Science of the Total Environment 409, 2011, 1219-1228.


Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Karla Čech Barabaszová, Ph.D.**

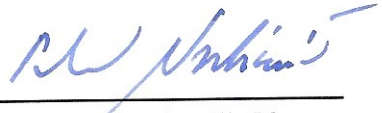
Konzultant bakalářské práce: Mgr. Ing. Hana Rajhelová

Datum zadání: 20.10.2016

Datum odevzdání: 15.05.2017

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Jaromír Pištor, CSc.  
vedoucí katedry



  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Petr Noskiewicz, CSc.  
prorektor pro studium

### **Místopřísežné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě dne.....

podpis .....

## Prohlášení o využití výsledků práce

Prohlašuji, že:

- jsem byla seznámena, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- беру на вѣдомі, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“ má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB – TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO v případě zájmy z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- беру на вѣдомі, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 10. 5. 2017

Julie Smijová

.....  
Bílovecká 919/54, Opava, 74706

## **Anotace**

Cílem práce bylo sledování schopnosti, získaných a připravených nanostrukturovaných materiálů na bázi oxidu zinečnatého, způsobovat peroxidaci lipidů. Tato schopnost je jedním z ukazatelů oxidačního stresu a tím toxicity materiálů. V teoretické části jsou shrnuty obecné poznatky o nanočásticích oxidu zinečnatého a antibakteriálních a toxických účincích nanočástic oxidu zinečnatého. Podrobněji je rozebrána problematika vlivu nanočástic oxidu zinečnatého na biosystémy a lidský organismus. V rámci experimentální části byly mechanochemicky připravené experimentální vzorky spolu se získanými komerčními nanočásticemi ZnO, charakterizovány pomocí rentgenové difrakční analýzy, skenovací elektronové mikroskopie s EDS a distribuce velikosti částic. Toxicitu nevykazovaly nanokompozity oxid zinečnatý/vermikulit, zatímco mechanochemicky připravené nanočástice ZnO se ukázaly jako toxické. Nejvyšší toxicitu z experimentálních vzorků měl komerčně připravený ZnO.

## **Klíčová slova**

oxid zinečnatý, nanočástice, toxicita, peroxidace lipidů

## **Annotation**

The aim was to study abilities obtained and prepared zinc oxide nanostructured materials, to induce lipid peroxidation. This ability is one of the indicators of oxidative stress and thus material toxicity. The theoretical part summarizes information about zinc oxide nanoparticles, antibacterial and toxic properties of zinc oxide. Further are discussed issues of influence of zinc oxide nanoparticles on human body. In the experimental part were mechanochemically prepared samples and obtained commercial ZnO nanoparticles characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy with EDS analysis and particle-size distribution. Nanocomposites zinc oxide/vermiculite did not behave like toxic, while were proved toxicity mechanochemically prepared ZnO nanoparticles. The highest toxicity was shown by the commercial ZnO.

## **Keywords**

zinc oxide, nanoparticles, toxicity, lipid peroxidation

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Karle Čech Barabaszové, Ph.D. za její cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Ing. Haně Rajhelové za vstřícnost a pomoc při provádění testů toxicity. Děkuji za čas, který mi věnovaly, připomínky, poskytnutou literaturu i náměty k vypracování řešené problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marianně Hundákové, Ph. D. za vyhotovení rentgenových difrakčních záznamů a pomoc při jejich zpracování.

# OBSAH

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>1 Teoretická část</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Oxid zinečnatý</b>	<b>3</b>
1.1.1 Nanočástice ZnO	4
1.1.2 Základní vlastnosti nanočástic ZnO v souvislosti s antibakteriálními účinky	5
1.1.3 Aplikace nanočástic ZnO	6
1.1.4 Užití nanočástic ZnO pro medicínské aplikace	7
1.1.5 Antibakteriální činidla v potravinářském průmyslu	8
<b>1.2 Interakce nanočástic ZnO s bio systémy a jejich složkami</b>	<b>10</b>
1.2.1 Cesty vstupu ZnO do organismu	11
<b>1.3 Mechanismy cytotoxicity indukované nanočásticemi ZnO</b>	<b>12</b>
1.3.1 Částicová interakce mezi buňkami a nanočásticemi ZnO	13
1.3.2 Mechanismy cytotoxicity způsobené chemickou podstatou ZnO	14
<b>1.4 Toxikologické studie zaměřené na působení ZnO na živé organismy</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Lipoperoxidace</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Vermikulit</b>	<b>23</b>
<b>2 Experimentální část</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Mechanochemická syntéza</b>	<b>25</b>
2.1.1 Příprava částic ZnO	26
2.1.2 Příprava kompozitního nanomateriálu ZnO/vermikulit s rozdílným koncentračním zastoupením nanočástic ZnO	27
<b>2.2 Charakterizace vzorků</b>	<b>27</b>
2.2.1 Rentgenová difrakční analýza	27
2.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie	31
2.2.3 Distribuce velikosti částic	35
<b>2.3 Testy toxicity</b>	<b>37</b>
2.3.1 UV/VIS spektrofotometrie	39
<b>3 Závěr</b>	<b>42</b>
<b>Literatura</b>	<b>43</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$A_{532,16}$	[-]	absorbance při vlnové délce 532,16 nm
AOX		antioxidanty
$B$	[°]	experimentální pološířka difrakce vzorku
EC <sub>50</sub>		koncentrace, při které dojde k úhynu nebo imobilizaci 50 % vystavených organismů
EDAX		energieově disperzní analyzátor
EDS		energieově disperzní spektroskopie
$L_c$	[nm]	velikost krystalitů
LD <sub>50</sub>		dávka, která způsobí 50% úhyn testovaných jedinců
M/ZnO/350		mechanochemicky připravený oxid zinečnatý kalcinovaný při teplotě 350°C
M/ZnO/650		mechanochemicky připravený oxid zinečnatý kalcinovaný při teplotě 650°C
M/ZnO/1V/350		mechanochemicky připravený nanokompozit oxid zinečnatý/vermikulit s nižším hmotnostním zastoupením vermikulitu kalcinovaný při teplotě 350°C
M/ZnO/1V/650		mechanochemicky připravený nanokompozit oxid zinečnatý/vermikulit s nižším hmotnostním zastoupením vermikulitu kalcinovaný při teplotě 650°C
M/ZnO/2V/350		mechanochemicky připravený nanokompozit oxid zinečnatý/vermikulit s vyšším hmotnostním zastoupením vermikulitu kalcinovaný při teplotě 350°C
M/ZnO/2V/650		mechanochemicky připravený nanokompozit oxid zinečnatý/vermikulit s vyšším hmotnostním zastoupením vermikulitu kalcinovaný při teplotě 650°C
N		negativní kontrola
P		pozitivní kontrola (TiO <sub>2</sub> )
PUFA		polynenasycené mastné kyseliny
ROS		reaktivní formy kyslíku
R8		nanočástice ZnO tyčinkovitého tvaru o velikosti 5-16 nm
R19		nanočástice ZnO tyčinkovitého tvaru s velikostí 16-48 nm

S25		nanočástice ZnO kulového tvaru o velikostí 36-68 nm
S38		nanočástice ZnO kulového tvaru o velikosti 50-122 nm
SE		režim sekundárních elektronů
V		vermikulit
ZnO/komerční		komerčně dostupné nanočástice oxidu zinečnatého
$d$	[nm]	vzdálenost mřížových rovin
$d_{43}$	[ $\mu\text{m}$ ]	přůměrná velikost vztažená na celkový objem
$d_{10}$	[ $\mu\text{m}$ ]	přůměrná velikost částic, kterých je 10 % v objemu
$d_{90}$	[ $\mu\text{m}$ ]	přůměrná velikost částic, kterých je 90 % v objemu
$k$	[-]	Scherrerova konstanta
$n$	[-]	řád difrakce
$\beta$	[°]	pološířka maxim difrakčního profilu
$\delta$	[%]	relativní odchylka
$\theta$	[°]	difrakční úhel
$\lambda$	[nm]	vlnová délka
$\lambda_{CuK\alpha}$	[nm]	vlnová délka $K_{\alpha}$ záření měděné lampy

## Úvod

Nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO) mají díky svým ojedinělým vlastnostem široké možnosti využití. Možné aplikace spadají snad do každého odvětví průmyslu. Momentálně nejpopulárnější oblast rozvoje je spojována s dvěma vlastnostmi, s antibakteriálními účinky a schopností absorbovat UVA i UVB záření. Jako antibakteriální činidla se vyskytují v pleťových krémech, antibakteriálních gelech na ruce, přidávají se do barev atd. Jako ochrana před škodlivým slunečním zářením jsou obsaženy v opalovacích krémech s vysokým UV faktorem. Vzhledem k rozšířenému přidávání nanočástic ZnO do běžně známých přípravků, které se denně využívají, je nutné zjistit, jaké účinky na nás nanočástice ZnO mohou mít.

Teoretická část obsahuje obecné informace o nanočásticích ZnO, základní vlastnosti související s jejich antibakteriálními účinky a jejich aplikace. K hlavním problematikám rozebíraných v teoretické části patří interakce nanočástic ZnO s biosystémy a jejich komponentami. V této části je rozebrána problematika, jaké jsou možné cesty vniknutí nanočástic ZnO do organismu a následně jaké procesy se v organismu následkem nanočástic ZnO odehrávají. Může dojít k poškození buněčných komponent, např. membrán vlivem oxidačního stresu, poškození DNA až ke konečné buněčné smrti.

V rámci experimentální části jsou mechanochemickou syntézou připraveny experimentální vzorky velikostně definovaných částic oxidu zinečnatého a částice nanokompozitů oxid zinečnatý/vermikulit. Připravené experimentální vzorky jsou srovnávány s komerčně získaným oxidem zinečnatým. Experimentální vzorky jsou podrobeny strukturní a fázové charakterizaci. Provedené charakterizace slouží k vyhodnocení toxického účinku. Testy toxicity jsou prováděny na modelové kyselině linolové, kdy je sledována schopnost nanočástic ZnO tvořit radikály a indukovat tak peroxidaci lipidů.

Cílem je zjistit, zda ovlivní přítomnost vermikulitu výslednou toxicitu nanočástic ZnO, je-li toxicita závislá na poměru zastoupení oxid zinečnatý/vermikulit a dále jaký má vliv teplota kalcinace experimentálních vzorků. Všechny připravené vzorky jsou srovnávány s komerčně získaným ZnO, aby bylo možné určit, zda jsou vzorky připravené

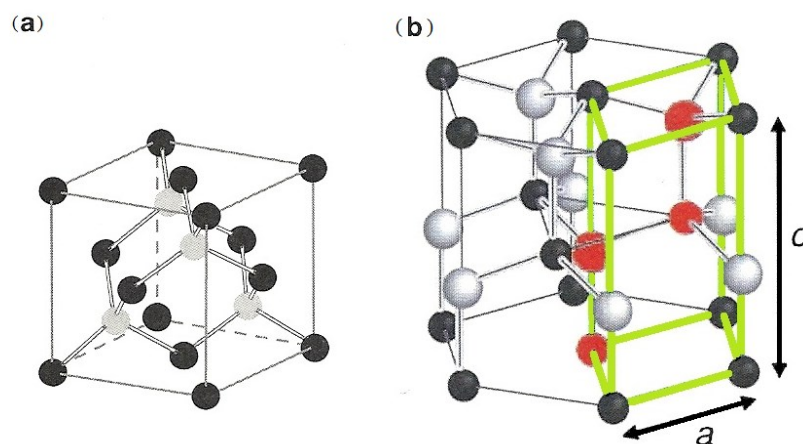
v rámci práce vhodnější pro použití v praxi, než dosavadně používané nanočástice ZnO. Metodika testů byla volena s ohledem na možnost provedení v běžných laboratorních podmínkách.

## 1 Teoretická část

Zinek je stříbro-šedý přechodný kov v běžném oxidačním stavu +2. Tvoří 5 stabilních izotopů. Po železu patří k nejdůležitějším a nejvíce vyskytujícím se stopovým prvkům v lidském těle. Celkový obsah zinku v těle je odhadován na 2g. Ve stravě je přibližné požadované množství na den 15 mg. [1] Zinek je přítomen ve všech tělesných tkáních a tekutinách. Hraje důležitou roli v imunitním systému především v aspektech hormonální a buněčné imunity. Pomáhá udržet buněčnou a orgánovou rovnováhu molekulárních složek membrán a buněčných komponentů. Zinek má roli při regulaci enzymů přítomných v těle, které se později podílejí na syntéze a degradaci sacharidů, lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Tak jako jiné stopové prvky, hraje klíčovou roli při udržování správné kondice metabolismu a buněčné homeostázy. Také hraje roli v genové expresi regulováním polynukleotidové transkripce. Ke koncentračně závislé absorpci zinku dochází v tenkém střevě, zatímco se z těla odbourává přes ledviny, játra, kůži a střevo. [2]

### 1.1 Oxid zinečnatý

Oxid zinečnatý (ZnO) je polovodičová sloučenina prvku II.B skupiny  $_{30}\text{Zn}$  a prvku VI.A skupiny  $_{8}\text{O}$ . Zinek má pět stabilních izotopů, s převládajícím zastoupením  $^{64}\text{Zn}$  (48,89 %),  $^{66}\text{Zn}$  (27,81 %) a  $^{68}\text{Zn}$  (18,57 %). Kyslík se vyskytuje téměř výhradně jako izotop  $^{16}\text{O}$  (99,76 %). Elektronovou konfiguraci zinku lze zapsat ve tvaru  $(1s)^2(2s)^2(2p)^6(3s)^2(3p)^6(3d)^{10}(4s)^2$  a kyslíku  $(1s)^2(2s)^2(2p)^4$ . Z konfigurace zinku a kyslíku v ZnO vyplývá hybridizace  $sp^3$  odpovídající čtyřstěnné geometrii (tetraedr). Obecně toto uspořádání tetraedrů může mít za následek buď kubickou strukturu „zinc-blende“ nebo hexagonální „wurtzite“ strukturu (Obr. 1). [3]



**Obr. 1:** Kubická „zinc-blende“ struktura (a), a hexagonální „wurtzite“ struktura se zeleně vyznačenou primitivní buňkou/mřížkou (b) [3].

Hexagonální struktura ZnO má mřížkové parametry  $a = b = 0,3249$  nm a  $c = 0,52042$  nm. [3] Struktura ZnO může být jednoduše popsána jako střídající se plochy složené z čtyřboce uspořádaných  $O^{2-}$  a  $Zn^{2+}$  iontů, uspořádaných střídavě podél osy  $c$ . Čtyřboké uspořádání má za následek středově nesouměrnou strukturu. [4] ZnO vazba vykazuje značnou polaritu, hlavně díky vysoké elektronegativitě kyslíku, vytváří tak kovalentní iontové vazby. [3] Další důležitou charakteristikou ZnO je polární povrch. Nejběžnější polární povrch je bazální rovina. Opačně nabitě ionty produkují pozitivně nabitě Zn-(0001) a negativně nabitě O-(0001) povrchy. Vlivem takového uspořádání dochází k normálnímu dipólovému momentu, spontánní polarizaci podle osy  $c$  a vzniku rozdílů v povrchové energii. K udržení stabilní struktury musí být obecně polární povrch rovný se zkosenými hranami a masivně povrchově upravován. Zatímco  $ZnO \pm (0001)$  má automaticky plochý a stabilní povrch bez úpravy. [4]

### 1.1.1 Nanočástice ZnO

Nanočástice ZnO mohou být připraveny několika různými způsoby za vzniku pevné, kapalně či plynné fáze. Existuje celá řada chemických metod přípravy, jsou to například mechanochemické procesy, srážení, srážení v přítomnosti povrchově aktivní látky, sol-gel metoda, solvotermální metoda, hydrotermální, mikroemulzní metody [5] a sonochemické [6]. Chemické metody jsou ekonomicky nejefektivnější, spolehlivé a ekologické. Poskytují řízení velikosti a tvaru syntetizovaných nanočástic. Nanočástice

s vysokým poměrem plochy povrchu k objemu jsou upřednostňovány. Pro vznik takovýchto nanočástic je důležitá stabilizace. Syntéza nanočástic není vhodná pro aplikace, pokud mají tendenci snadno aglomerovat na částice o velikosti makro. Užívá se proto stabilizace pomocí povrchově aktivních látek, polymerních molekul, nebo některých organických molekul navázaných na povrch částic. Hlavním významem nanočástic je možnost vývoje nových unikátních fyzikálně-chemických, strukturních, elektrických a magnetických vlastností nanočástic, které se neprojevují v jejich makro a větších velikostech. [7] Tyto nové vlastnosti jsou hlavně odpovědné za jedinečné a rozsáhlé aplikace nanočástic v biologických a lékařských odvětvích. [8] ZnO nanočástice mají nyní široké spektrum aplikací v léčbě rakoviny, bio snímání, léčivech, transportu genu, biomateriálech pro tkáňové inženýrství a polymerech s tvarovou pamětí [9]. Již byly syntetizovány různé nanostruktury ZnO, jako jsou nanovlákna, nanotrubičky, nanopásky a další formy. [8]

### ***1.1.2 Základní vlastnosti nanočástic ZnO v souvislosti s antibakteriálními účinky***

Velikost je jednou z klíčových vlastností nanočástic. Velikost v rozsahu 10-100 nm je považována za vhodnou pro biologické aplikace. Spodní hodnota rozsahu velikosti je založena na měření „sieving“ (=“permeabilitní“) koeficientu glomerulární kapilární stěny. „Sieving“ koeficient určuje, kolik látky projde přes stěnu. Rovná-li se koeficient 1, prochází vše, rovná-li se 0, je stěna pro látku nepropustná. Jako práh prvního průchodu stěnou orgánu (konkrétně ledvinami) se odhaduje na 10 nm v průměru. Horní rozsah je založen na výsledku různých studií ukazujících, že až do 100 nm vykazují nanočástice lepší schopnost pronikat kapilárami stěn. Odborné publikace poukazují [10], že nanočástice menší než 10 nm se hromadí efektněji a pronikají hlouběji do nádorů, ale v oblasti pod 10 nm mohou nanočástice způsobovat celou řadu toxických problémů v buňkách. Nano rozměr umožňuje snadný vstup do buňky a má schopnost manipulovat s buněčnou funkcí, vedoucí k cytotoxicitě. Nanočástice mohou interagovat s biologickými molekulami a ovlivňovat různé buněčné cykly. Narušení buněčné homeostázy ovlivní schopnost plazmatické membrány kontrolovat buněčnou rovnováhu a dochází k apoptóze. [7]

Ústředními buňkami imunity orgánů jsou rezidentní makrofágy, které v tkáni jater a sleziny rychle odstraní většinu částic vstupujících do krevních cév. Částice pod 10 nm vykazují zvýšenou cytotoxicitu a pronikavost do jader. [11, 10]

Jak již bylo uvedeno díky nano rozměrům mají nanočástice velký podíl povrchu k objemu. Tato vlastnost umožňuje zvýšení kontaktu s povrchem, zvýšenou reaktivitu a rozpustnost. Na povrchu nanočástic mohou být konjugovány různé ligandy a molekuly. To je důležitý aspekt pro nanočásticové doručování léčiv. [7] Povrchový náboj nanočástic má také významný vliv na jejich přilnavost. Velké povrchové náboje vedou ke zvýšení makrofágové aktivity způsobující rychlé odstranění nanočástic z krevního řečiště. [12]

Mnoho výzkumů na téma toxicita nanočástic ZnO ve vodním prostředí se shoduje na akutní toxicitě u vodních i suchozemských organismů [13,14]. Při zvýšené rozpustnosti a tedy i zvýšené koncentraci iontů  $Zn^{2+}$  v extracelulárních i intracelulárních tekutinách, dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů na extrémně velkém povrchu nerozpuštěných nanočástic. Typické radikály jsou ROS (reaktivní formy kyslíku) například  $\bullet HO^-$ ,  $HO_2\bullet$ ,  $RO\bullet$ ,  $RO_2\bullet$  a  $\bullet O_2^-$ . Rozpustnost ZnO závisí na rozpouštědle, teplotě a také velikosti a tvaru nanočástic. Schopnost tvořit ionty  $Zn^{2+}$  se zvyšuje se zvyšující přítomností komplexotvorných iontů  $NH_4^+$ ,  $Cl^-$ , nebo  $SO_4^{2-}$ . Naopak jiné anionty způsobují srážení (precipitaci) za vzniku méně rozpustných sloučenin jako je  $ZnCO_3$  nebo  $Zn_3(PO_4)_2$ . Pro přesné stanovení rozpustnosti je třeba uvažovat komplexní chemickou rovnováhu v roztoku a jeho reálné chování. Z dosavadních výsledků byl zjištěn výrazný exponenciální pokles rozpustnosti se zvyšujícím se poloměrem sférických nanočástic. [15, 16]

### ***1.1.3 Aplikace nanočástic ZnO***

Nanočástice ZnO se přidávají k aktivátorům vulkanizace v gumárenském průmyslu, dále ke katalyzátorům a aditivům v petrochemickém průmyslu. Jsou vhodné pro výrobu pneumatik, průmyslových kabelů. Při přidání do nátěrových hmot, plastických hmot a latexu, se využívá schopnosti nanočástic ZnO zvýšit kompaktnost, adhezi a vytvořit hladký povrch výrobků. Díky svým antibakteriálním účinkům se používá v deodorantech a ke sterilizaci v oblasti zdravotnického průmyslu. [17]



Široké uplatnění mají také nanočástice ZnO v odvětví elektroniky, konkrétně pro výrobu elektrických zařízení, bezdrátových fluorescenčních lamp, reostatů, atd. ve formě nanodrátů a kvantových teček. [8] ZnO nanočástice jako polovodiče s širokým zakázaným pásem mohou snadno absorbovat UV záření. Tuto schopnost je možné uplatnit v kosmetice, elektronických přístrojích a u biomedicínských aplikací. [7] Obecně známé je použití nanočástic ZnO o velikosti přibližně 100 – 200 nm v opalovacích krémech, díky vlastnosti absorbovat UVA i UVB záření poskytují širokospektrální ochranu. [18]

#### ***1.1.4 Užití nanočástic ZnO pro medicínské aplikace***

Aplikace nanočástic ZnO v medicíně jsou rozmanité, patří k nim výzkumy v polymerním nanospojování, tvorba biohybridních systémů (umělé svaly), regenerativní medicína (nervové buňky, kostní tkáň), nanomedicína (podávání léků, buněčná terapie) a další. [19, 20]

ZnO nanočástice vykazují povahu cytotoxicity na rozdíl od jiných nanočástic, což se dá využít v boji proti rakovinným buňkám. Základním řešeným problémem je, jak zacílit působení nanočástic ZnO jen na degenerované (rakovinné) buňky. Dosavadní chemoterapie mají zásadní problém právě v cílení destruktivních látek na konkrétní místo nádoru. Vzhledem k vyšší povrchové aktivitě nanočástic, není zapotřebí velké množství aktivní látky. Snahou je docílit zvýšené selektivity, aby nedocházelo k rozšířeným destrukcím i zdravých buněk. [21] Díky různorodosti metod syntézy je možné snadno kontrolovat velikost částic. Dosavadní výzkumy ukázaly, že velikost nanočástic je přímo úměrná toxicitě. [10]

Nanočástice ZnO, které mají velikost v nanometrech jen v jednom či dvou směrech, vykazují vysokou biokompatibilitu, jsou tedy obecně považovány za bezpečné. Zinek je důležitý kofaktor v různých buněčných mechanismech a hraje důležitou roli v udržování stabilního prostředí v buňkách, proto je možné využití nanočástic ZnO v těle v případě jejich rozkladu v organismu. [7] Konkrétně nanodrátky ZnO v koňské krvi vydrží několik hodin a poté degradují na minerální ionty, které mohou být absorbovány v místech, kde je ZnO součástí těla. [22] Neproniknou-li nanočástice ZnO do buňky, vykazují

biokompatibilitu, zatímco zvýšená hladina podaného ZnO intracelulárně ukazuje narůst cytotoxicity. Nanočástice ZnO mají jedinečnou schopnost indukovat oxidační stres (viz text dále) u rakovinné buňky. Avšak oxidační stres je jedním z mechanismů cytotoxicity (viz dále). Důsledkem polovodičového charakteru ZnO, se vyvolá generace reaktivní formy kyslíku, což vede k oxidativnímu stresu. Jakmile je anti-oxidativní kapacita buněk překročena, dochází k buněčné smrti. [7] Vlastnosti jako jsou biodegradabilita (úplná biologická rozložitelnost) a biokompatibilita (snášlivost materiálu s biologickým prostředím) umožňuje využití pro *in situ* biosenzory a biodetektory. [22]

Nanočástice oxidu zinečnatého jsou součástí materiálů pro dočasné zubní výplně. Jedním takovým je FILTEMP obsahující oxid zinečnatý, tuhou vazelinu, oxid křemičitý a síran vápenatý. Výhodou je rychlé tuhnutí (v rozmezí 10-20 min) po reakci se slinami a vlivem teploty v ústech za současné expanze a utěsnění okrajů. Dále se používá dočasný výplňový materiál oxid zinečnatý-prášek, konkrétně jako dočasná či trvalá cementační látka a chirurgický cement. [23]

Jedním z nejstarších typů cementů je zinkfosfátový cement vhodný pro provizorní výplně a fixaci materiálů. Hlavní složkou je prášek oxidu zinečnatého (90 %) s oxidem hořečnatým (10 %) a 33-40% roztok kyseliny fosforečné. Nevýhodou je nízká adheze k zubním tkáním a eroze ve vodném prostředí. K méně vhodným kvůli své nízké pevnosti a rozpustnosti ve vodě patří zinkoxid-eugenolové cementy. Patří také pouze k provizorním výplním a fixačním látkám. Jedná se o prášek ZnO pokrytý Zn stearátem, Zn octanem, popřípadě  $Al_2O_3$ , pro zvýšení pevnosti, a tekutinu obsahující eugenol, olej, kalafunu a kyselinu octovou. Pro zvýšení pevnosti se používá poly(methylmetakrylát). Nespornou výhodou je dobrá biologická snášlivost, antibakteriální vlastnosti, zklidňující efekt, rychlé tuhnutí a snadné odstranění náhrady. [24]

#### ***1.1.5 Antibakteriální činidla v potravinářském průmyslu***

Zvýšená četnost infekcí patogenních kmenů, bakteriální rezistence vůči antibiotikům, vznik nových bakteriálních mutací, nedostatek vhodné vakcíny v rozvojových zemích a infekce v nemocnicích, jsou globálním rizikem pro člověka. Například infekce *Shigella*

*flexneri* způsobuje 1,5 miliónů úmrtí ročně, v důsledku kontaminování potravin a nápojů těmito bakteriemi. [25]

Výzkumy nanočástic ZnO jako antibakteriálního činidla se staly interdisciplinárním tématem. Fyzici, biologové, chemici a lékaři se zabývají jeho problematikou, proto je velký rozsah jejich aplikací. Jednou z těchto základních aplikací je potravinářský průmysl při využití jako antibakteriální činidlo v obalech potravin a jejich vzniklých patogenů. Nanomateriály mají velkou účast v potravinářské technologii pro svou vysokou reaktivitu, zvýšenou biologickou dostupnost a bioaktivitu. Některé z hlavních výhod užívání nanočástic v potravinářství jsou jejich přídavky na povrch potravin, kde inhibují bakteriální růst. Také se používají inteligentní obalové materiály s nanočásticemi. [26, 27]

P. Kaur a P. Narayanan a kol. [28, 29] zjistili, že nanočástice ZnO mohou omezit a běžně zabíjet hlavní patogeny v potravinách. Zkoumali baktericidní aktivitu nanočástic ZnO (o velikosti 8-10 nm) proti *Escherichia coli* (*E. coli*) a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Bylo zjištěno, že jsou účinné při koncentraci 80 a 100 g.l<sup>-1</sup>. Tato koncentrace naruší buněčnou membránu, což způsobí vytékání cytoplazmy. Testována byla i antibakteriální aktivita ZnO nanočástic proti některým lidským patogenům jako je *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *E. coli*, *S. aureus* a *Enterococcus faecalis*. Bylo zjištěno, že ZnO nanočástice mají silnou antibakteriální aktivitu vůči těmto lidským patogenům. Nanočástice nanesené na povrch potravin, kde se bakterie vyskytují, působí jako bakteriostatické nebo baktericidní činidlo, zastaví se růst bakterií, a tím je zabráněno zkažení potravin [30]. Tento typ aktivního obalu se nazývá antimikrobiální obal, ve kterém dochází k usmrcení nebo inhibici růstu bakterií na povrchu potravin, vlivem přímé interakce mezi produktem a nanočásticemi. [31]

Přestože nanočástice ZnO mají rozmanité medicínské aplikace, přímý přídavek vysoce koncentrované antibakteriální látky do balených potravin se nedoporučuje. Použité antibakteriální látky postupně difundují do potravinové matrice, čímž se snižuje možnost kontaminace patogenem. Je tak získán výrobek s prodlouženou trvanlivostí proti *P. aeruginosa* a *E. coli*. Nanočástice ZnO připravené mokrou chemickou metodou

vykazují snížení rychlosti růstu obou zmiňovaných bakterií při 100% koncentraci inhibičních látek. To vysvětluje inhibici růstu v důsledku poškození buněčné membrány proniklých nanočástic ZnO. Nanočástice ZnO syntetizované mokrou chemickou cestou jsou potenciální antibakteriální látky vzhledem ke své přirozené schopnosti absorbovat UV záření a díky své optické transparentnosti. [19, 20]

Uvedené skutečnosti ukazují na prokazatelnost antibakteriálních účinků nanočástic ZnO. Využití této vlastnosti je rozšířené do mnoha oborů, proto nelze zapomenout na otázky jejich vlivu na organismus.

## **1.2 Interakce nanočástic ZnO s bio systémy a jejich složkami**

Pro zhodnocení vlivu nanočástic na biosystémy, tedy jejich toxického účinku je třeba nejprve provést kompletní fyzikálně-chemickou charakterizaci materiálu s důrazem na určení povrchového náboje, chemického složení, tvaru povrchu, defektů povrchu, porozity, velikosti povrchu apod. [32], které toxicitu materiálu mohou ovlivňovat stejně jako aglomerace a agregace nanočástic. Nanočástice tvořící agregáty mohou současně vykazovat chování typické pro nanočástice i pro mikročástice. [33]

Účinek nanočástic ovlivňují i další parametry, spojené především s vystavením biosystémů testovanému materiálu. Je nutné stanovit dobu expozice testované látky, její dávku, pravděpodobnou cestu vstupu látky do organismu a pravděpodobný mechanismus jejího účinku v organismu. [33] Doba expozice vypovídá o tom, jak dlouho byl určitý organismus vystaven působení nanomateriálu. Podle trvání expozice rozlišujeme expozici akutní jednorázovou (pronikne-li látka do organismu jednorázově) a projeví-li se nepříznivé účinky na organismus během několika dní po podání dávky. Subakutní, kdy látka působí po dobu max. 4 týdnů, subchronickou, doba působení je 1-3 měsíce a chronickou, kdy doba působení je delší než 3 měsíce. U chronického účinku se tedy jedná o vystavení látky opakovaně po dlouhou dobu a projev nevratných účinků až po několika letech. [32]

Obecně je nutné nahlížet na toxicitu nanočástic v dlouhodobějším měřítku. Pravděpodobně je nelze považovat za akutně toxické látky. Nanočástice mají tendenci se

v organismu kumulovat vlivem malé schopnosti organismu tyto látky odbourávat. V některých případech se projeví toxicita, až opakovanou expozicí nanočásticím. Jedná se o tzv. opožděnou toxicitu. Projevují-li se příznaky toxicity jen v oblasti prvního kontaktu nanočástic s biologickým systémem, mluvíme o tzv. lokální toxicitě. [32]

Dávka je množství látky, které pronikne do organismu. V případě je-li absorpce látky vyšší než rychlost její biotransformace a exkrece, dochází k hromadění nanočástic v organismu. Kumulace způsobuje zvyšující se koncentraci nanočástic v tkáních, což může vést k jejich nevratnému poškození. [32]

### ***1.2.1 Cesty vstupu ZnO do organismu***

Je několik způsobů jak mohou částice ZnO vstupovat do organismu. Nejpravděpodobnějším způsobem je vdechnutím nebo požitím. Méně pravděpodobné, avšak také možné, je vniknutí nanočástic póry pokožky. Možné cesty vstupu úzce souvisí s výskytem nanočástic ZnO v životním prostředí, materiálech a výrobcích ze kterých mohou být uvolňovány (výskyt a použití ZnO je podrobněji popsán v kapitole 1.1.3 Aplikace nanočástic ZnO).

Nanočástice mají vlivem svých malých rozměrů velkou tendenci setrvávat v ovzduší. Účinek nanočástic na organismus se odvíjí od několika faktorů: jsou-li vdechnuty ústy či nosem, doba expozice, velikost částic, koncentrace nanočástic v ovzduší a dechová frekvence exponované osoby. Částice větší než 10  $\mu\text{m}$  jsou zachyceny v horních cestách dýchacích, částice velikosti přibližně 2,5  $\mu\text{m}$  snadno pronikají do průdušek. Obě tyto velikostní frakce podléhají z velké části samočisticím procesům v dýchacích cestách a jsou z nich odstraněny. Částice o velikosti 1-3  $\mu\text{m}$  se v průduškách usazují a nanočástice (pod 100 nm) pronikají až do plicních sklípků, odkud se mohou dostat do krevního řečiště a následně dále do organismu. [32]

V odborné literatuře je diskutována i možnost vstupu ZnO přes kůži, především v souvislosti s opalovacími krémy, ve kterých může být tato složka obsažena. Svrchní zrohovatělý povrch kůže poměrně dobře brání průniku nanočástic do těla, ale riziko nastává v případě narušení této vrstvy. Přes kůži snadno pronikají např. nanočástice

lipofilního charakteru, v místech potních žláz, chlupů a vlasů. Pro látky nerozpustné ve vodě, jako jsou i nanočástice ZnO, je složité přes kůži proniknout. Dostanou-li se nanočástice až k cévnímu zakončení, je možný jejich průnik do krevního řečiště. [32]

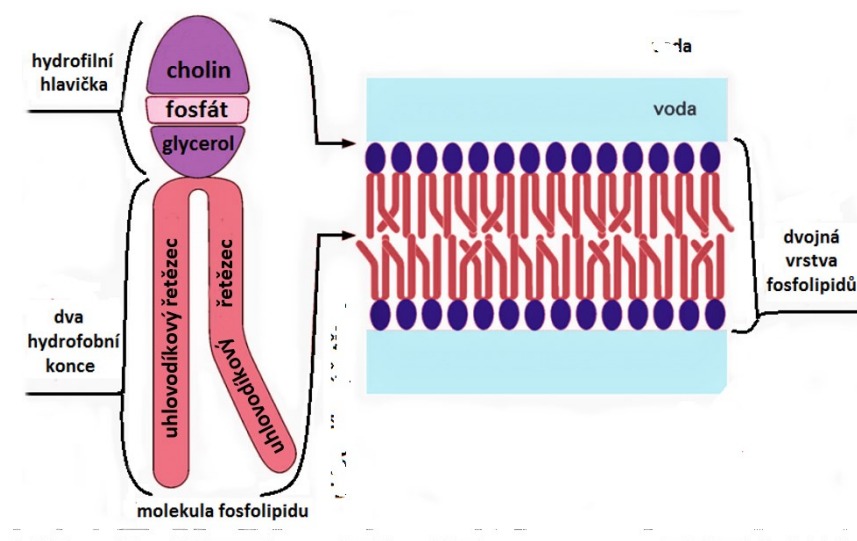
Do trávicího traktu se mohou nanočástice dostat potravou, případně spolknutím částic, které byly vypuzeny z plic. Velký povrch střeva zvyšuje pravděpodobnost průniku nanočástic přes klky do krevního řečiště. Vstřebávání přes stěnu střeva částečně zabraňuje hlen na povrchu sliznice. Obecně mají schopnost pronikat přes stěny střeva částice menší než 1  $\mu\text{m}$ . V trávicím ústrojí jsou nanočástice vystaveny mnoha faktorům, které ovlivňují jejich výsledný vliv na organismus. Důležité jsou interakce nanočástic s trávicími enzymy a tekutinami. [32]

### **1.3 Mechanismy cytotoxicity indukované nanočásticemi ZnO**

Nanočástice ZnO mohou pravděpodobně s biosystémy a jejich složkami interagovat několika způsoby. Nejvýznamnějšími z nich je přímá interakce nanočástic s buňkami a ovlivnění, vyplývající z jejich chemického složení. Schopnost látek poškozovat buňky a vést k jejich destrukci se obecně nazývá cytotoxicita. Podstatné je uvědomit si, co to vlastně buňky jsou a jaké mají složení. [34]

Všechno živé se skládá z malých membránou ohraničených jednotek naplněných koncentrovaným vodným roztokem chemických sloučenin. Jedná se o útvary zvané buňky, které mají schopnost se dělit a růst. Nejmenší a nejjednodušší buňky jsou bakterie. Podstatnou částí buňky je buněčná membrána tvořena lipidy a proteiny. Aby buňka mohla zůstat živá, musí membrána umožňovat průnik látek dovnitř i ven z buňky. Při rychlém růstu buňky má membrána v případě narušení schopnost se rychle zacelit. Prokaryotní buňky (např. bakterie) obsahují jen jednu plasmatickou membránu, zatímco eukaryotní buňky obsahují celou řadu membrán. Základem membrány je lipidová dvojná vrstva o tloušťce přibližně 5 nm (50 atomů). Jeden membránový lipid obecně obsahuje hydrofilní hlavičku a hydrofobní konec. Dvojvrstva je vytvořena podle obecného chování látek ve vodním prostředí, kdy hydrofobní konce se nasměrují k sobě, zatímco hydrofilní hlavičky jsou nasměrovány k vodnímu prostředí. Nejhojnějšími membránovými lipidy jsou fosfolipidy. Konkrétně se může jednat o fosfatidylcholin s polární hlavičkou

tvořenou malou molekulou cholinu připojenou přes fosfátový zbytek ke glycerolu, který je spojen s hydrofobní částí tvořené dvěma uhlovodíkovými řetězci (Obr. 2). [32]



**Obr. 2:** Molekula lipidu utvářející lipidovou dvojvrstvu [32].

Přes lipidovou membránu poměrně snadno pronikají malé nepolární molekuly (např.  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$ , ...), malé nenabitě polární molekuly (např.  $H_2O$ , glycerol, ethanol, ...), ty mohou vstupovat difuzí. Naopak pro všechny ionty ( $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ...) je lipidová dvojvrstva nepropustná, při jejich průchodu pak hrají důležitou roli transportní proteiny. [32]

### 1.3.1 Částicová interakce mezi buňkami a nanočásticemi ZnO

Porozumění k jakým interakcím dochází mezi nanočásticemi a povrchem buněk je důležité pro pochopení mechanismu jejich působení v biologických systémech a případné využití např. pro medicínské a biologické aplikace. Nano-bio rozhraní je dynamická fyzikálně-chemická interakce mezi povrchem nanomateriálu a povrchem biologické složky, která je ovlivněna kinetickými a termodynamickými výměnami na společném rozhraní. [35] To zahrnuje veškeré interakce, pevná látka-kapalina a pevná látka-pevná látka, probíhající na rozhraní kontaktní zóny částice s biologickou membránou. Různé síly hrají důležitou roli v adhezivních interakcích nanočástic na povrchu buňky a v jejich pasivním příjmu do buněk. Adhezivní interakce nanočástic k povrchu buňky je zvýhodněná optimálním povrchem nanočástic. Je-li velikosti nanočástic srovnatelná

s velikostí běžných ligandů/biomolekul, dochází k adhezivním interakcím a pasivnímu příjmu dovnitř buňky, bez potřeby procesu fagocytózy. [7] Díky pasivnímu příjmu mohou nanočástice přímo interagovat s cytoplazmatickými proteiny a buněčnými organelami, což může vést ke zvýšení cytotoxicity. Nanočástice se mohou nacházet kdekoli uvnitř buňky např. ve vnější membráně, cytoplazmě, lipidových váčcích, mitochondriích, jaderných membránách, jádrech, DNA a dalších organelách. Poškození buněčných organel v konečném důsledku vede k buněčné smrti. [36]

Mimo interakcí na nano-bio rozhraní, hrají další důležitou roli i interakce nanočástic mezi sebou. Mezi ně patří působení různých sil např. Van der Waalsovy síly, elektrostatické, solvatační nebo solvofobické, které mají vliv na rychlost aglomerace nanočástic v mediu. [37] Van der Waalsovy síly působí jako přitažlivé síly. Vyplývají ze změn v dipólovém momentu elektronů, které indukují dipólový moment přilehlých atomů. Tato skutečnost je vyvozena z kvantové mechaniky pohybu elektronů. [38] Jsou-li nanočástice ZnO suspendovány ve vodných systémech, dochází obvykle k agregaci. Tato schopnost kumulovat a vytvářet tak větší částice by mohla být dalším faktorem ovlivňujícím cytotoxicitu. [39]

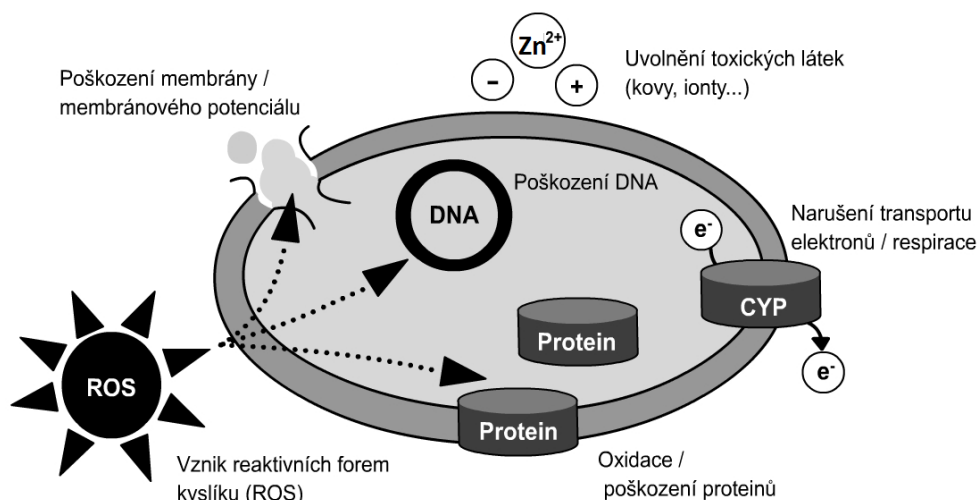
Ze studia těchto interakcí lze odvodit použití optimálních povrchově aktivních látek a polymerů pro stabilizaci nanočástic a jejich optimální rozptýlení v mediu. [7]

### ***1.3.2 Mechanismy cytotoxicity způsobené chemickou podstatou ZnO***

Z chemické podstaty nanočástic ZnO vyplývá jejich toxicita spojená s intracelulárním uvolňováním iontů zinku následovaný produkcí reaktivních kyslíkových forem (ROS). Tato událost způsobí proteinovou nerovnováhu a oxidační stres, případně usmrcení buňky. Rozpustný extracelulární zinek vykazuje velmi malou cytotoxicitu. Výzkum ukazuje, že pokud je buněčná kultura v prostředí obsahujícím fosforečnany, dochází po vystavení kultury extracelulárně rozpustnému zinku ke vzniku špatně rozpustné amorfnní formy fosforečnanu zinečnato-uhličitého a tato sraženina chrání buňky před cytotoxicitou zinku. [40] Uvolňování rozpustných zinečnatých iontů uvnitř buňky zahajuje kaskádu provázaných dějů, které jsou odpovědné za cytotoxicitu nanočástic ZnO (Obr. 3). Tyto procesy obecně probíhají třemi cestami: zinkem zprostředkovaná



proteinová nestabilita, produkce ROS a poslední možností je poškození DNA s následnou apoptózou. [7]



**Obr. 3:** Možné mechanismy účinku nanočástic ZnO. [41]

Zinek je jedním z hlavních stopových prvků vyskytujících se v lidském těle. Je udržován v koncentraci 0,001-0,1 % uvnitř buněk (mikrobiogenní prvek). Změna této koncentrace zinku v buňce může způsobit vážné problémy v různých buněčných procesech. Zinek je kofaktorem více než 300 enzymů savců. [7] Vlivem ZnO nanočástic a intracelulárního uvolňování zinečnatých iontů, koncentrace iontů  $\text{Zn}^{2+}$  v buňce stoupá nad běžnou hladinu, což vede k **zinkem zprostředkované proteinové nestabilitě** („*zinc-mediated protein activity disequilibrium*“). To má vliv na celou řadu důležitých procesů, zahrnující replikaci DNA, opravy poškození DNA, apoptózu, oxidační stres, buněčnou homeostázu a tedy celkově toxicitu vůči buňkám. [42]

Nanočástice ZnO jsou přijímány buňkou prostřednictvím endocytózy, konkrétně procesy pinocytózy nebo fagocytózy díky endozomům a lyzozomům. Se snižujícím se pH se rychlost rozpouštění ZnO rapidně zvyšuje. [43] Hodnota pH časného endozomu je relativně nízká (6,3) a napomáhá uvolňování rozpuštěných iontů zinku. Dále se sníží na pH 5,5 v konečné fázi endozomu a na pH 4,7 v lyzozomu, kde je pozorováno rychlé rozpouštění ZnO, způsobující destabilizaci lyzozomů. To naznačuje, že pro uvolňování

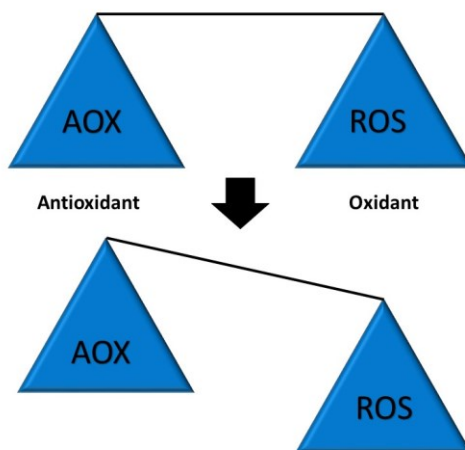
iontů zinku je nezbytné nízké pH. Normální pH krve má hodnotu kolem 7,4, proto není krev příznivým prostředím pro uvolňování zinečnatých iontů. [42] Zvýšení koncentrace zinku uvnitř buněk vede k zinkem zprostředkované proteinové nestabilitě a tím k cytotoxicitě. Zvýšení koncentrace rozpustných iontů zinku také zvyšuje koncentraci ROS, vedoucí k cytotoxicitě skrze oxidativní stres. [14]

Reaktivní formy molekulárního kyslíku jsou produkovány uvnitř buňky i za fyziologických podmínek v průběhu různých buněčných procesů, zahrnujících mitochondriální respiraci, zánětlivé reakce, činnost mikrozomů, činnost peroxizomů, které hrají důležitou roli v buněčné signalizaci a homeostázi. Dále mohou být ROS produkovány i jako odpověď na různé vnější podněty, včetně nanomateriálů. [44] ROS jsou produkovány ZnO nanočásticemi dvěma způsoby. V důsledku protizánětlivé odpovědi buňky vůči nanočásticím. Druhý je důsledkem charakteristické vlastnosti povrchu nanočástic ZnO, umožňovat redoxní reakci systému pro produkci ROS. [7]

Schopnost indukovat *oxidační stres prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku* z nanočástic ZnO je způsobena jejich polovodičovými vlastnostmi. ZnO je polovodič s širokým zakázaným pásem s přesnou hodnotou 3,37 eV a excitační energií 60 MeV. [45] Jako polovodič nemá kontinuální pruh elektronových stavů jako jiné kovy. Valenční vrstva a vodivostní pás jsou od sebe separovány značně velkou energetickou mezerou. Za normálních okolností je UV světlo vyžadováno k dosažení elektronů zakázaného pásu z valenční vrstvy, přičemž opouštějí díry ve valenční vrstvě. Vedení elektřiny probíhá pohybem volných elektronů ve valenčním pásu, ale v případě nanočástic ZnO elektrony skáčí do vodivostního pásma za nepřítomnosti UV záření. [46] Elektrony a díry se většinou rekombinují rychle, zatímco v případě nanočástic, se pohybují po jejich povrchu, kde reagují s adsorbovanými látkami. To má za následek zvýšení počtu elektronových děr na povrchu nanočástic. Tato zvláštní vlastnost může být důsledkem krystalové vady nanočástic, vlivem jejich nano velikosti. [7]

Díry působí jako silné oxidanty, přetvářející molekuly vody na vodík a hydroxylový radikál. Elektrony působí jako silné redukční činidla, reakcí s absorbovanými a rozpuštěnými molekulami kyslíku může být generován superoxidový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Tyto superoxidové radikály dále reagují s vodíkovými ionty, za vzniku  $\text{HO}_2^{\cdot-}$  radikálů, které dále reagují za tvorby  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Všechny tyto radikály působí jako silná oxidační činidla. Jejich nashromáždění ve velkých množstvích, vede k narušení oxido-redukční rovnováhy (Obr. 4) v buňce, což způsobí oxidativní stres, který může vést k poškození až buněčné smrti. [47]



**Obr. 4:** Znázornění nerovnováhy mezi hladinou antioxidantů a reaktivních forem kyslíku vedoucí k oxidativnímu stresu. [32]

Zvýšenou hladinou ROS a taky oxidativním stresem vyvolaným ZnO nanočásticemi dochází k poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin v buňce. Konkrétně k poškození buněčné membrány skrze peroxidaci lipidů a denaturaci bílkovin a **poškození DNA** což může vést k buněčné smrti nekrotickou i apoptotickou (programovaná buněčná smrt). Vysoce reaktivní druhy ROS mohou reagovat se složkami DNA, měnit složení DNA za vzniku mutací. Poškození DNA vede hlavně ke vzniku dvouvláknových DNA zlomů a DNA bílkovinné příčné vazby.  $\cdot\text{OH}$  radikál způsobuje jednovláknové poškození v DNA prostřednictvím tvorby 8-hydroxy-2-deoxyguanosin DNA aduktů. Tato poškození DNA vedou k aktivaci mitochondriální apoptické dráhy a nakonec k apoptóze buňky. Apoptóza je předpokládána jako hlavní mechanismus buněčné smrti v otázkách cytotoxicity nanočástic ZnO. [7]

Bližší výzkum ROS, produkovaných v reakci na ZnO ukázal, že použití antioxidantů a ROS zhasičů nevýrazně snižuje cytotoxicitu. To naznačuje, že produkce ROS nemusí

být hlavním mechanismem cytotoxicity nanočástic ZnO. Přestože ROSy jsou také produkovány interakcí ZnO s buňkou, hlavním zdrojem jejich produkce může být reakce na zinkem zprostředkovanou proteinovou nestabilitu. Jejím následkem je například propustnost mitochondrií, ze kterých se uvolňují velká množství ROS do buněk. Jako hlavní mechanismus cytotoxicity nanočástic ZnO lze tedy považovat zinkem zprostředkovanou proteinovou nestabilitu v důsledku zvýšené koncentrace volných zinkových iontů uvnitř buňky. [7, 40, 42]

#### 1.4 Toxikologické studie zaměřené na působení ZnO na živé organismy

Na téma toxicita ZnO bylo provedeno mnoho výzkumů. Po době expozice 30 min, byla stanovena účinná koncentrace označována  $EC_{50}$ , při které dochází ke změnám v chování organismu (např. 50 % jedinců ztratí schopnost pohybu), podobná pro nanočástice ZnO, mikročástice ZnO a  $Zn^{2+}$ . V tak krátké době nelze účinky toxicity objektivně sledovat, proto většina výzkumů má minimální dobu expozice 24 hod. Toxické účinky na organismus již byly studovány různými způsoby.

V bakteriálních testech toxicity byly ZnO nanočástice důkladně dispergovány v kultivačním médiu. Podle studie Hu a kol. byly ZnO nanočástice nejvíce toxické pro *E. coli* a měly nižší hodnoty  $LD_{50}$  (dávka, která způsobí 50% úhyn testovaných jedinců) než jiné nanočástice oxidu kovů ( $TiO_2$ , CuO) [50]. To poukazuje na skutečnost, že toxické vlastnosti samotných kovů také hrají určitou roli v toxicitě nanočástic oxidů kovů. Některé výsledky ukázaly, že nanočástice ZnO silně potlačují růst kvasinek. Senzor bakterii citlivý na výskyt Zn ukázal, že toxický účinek je vyvolán rozpadem částic, které mohou narušit homeostázu (stálou koncentraci) Zn v buňce. Zkoumané buňky *E. coli*, vykazovaly trojnásobně větší membránovou dezorganizaci než jiné zkoumané bakterie a zvýšenou propustnost membrán po vystavení nanočásticím ZnO, které jsou akumulovány a zadržovány v buněčných membránách. Díky antibakteriálním vlastnostem můžou být nanočástice ZnO použity jako velice účinná antibakteriální činidla. [12]

Mimo jiné byl zaznamenán toxický účinek i na životní prostředí. Ve srovnání s nanočásticemi jsou mikročástice ZnO méně toxické pro vodní organismy. [12] Lin

a kol. měřili kořenový růst a klíčení semen rostlin, po ošetření pěti typy kovů a oxidů kovů. Výsledky ukázaly, že Zn a ZnO nanočástice zjevně inhibují růst semen žita a kukuřice. Suspenze 2000 mg/l prakticky ukončila růst kořene. [49] Franklin a kol. uvedli, že nanočástice ZnO inhibují růst zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*. [50] Xiong a kol. prokázali akutní toxicitu ZnO nanočástic, při působení na rybu *Danio rerio* (danio pruhovaný), kdy byla prokázána závislost na koncentraci ve vodním prostředí. Úhyn dania pruhovaného způsobila už koncentrace dosahující 2 mg/l. Účinky byly testovány pomocí izotopicky označených nanočástic ZnO. [51]

Další studie toxicity ukázaly, že vystavením suchozemského členovce stinky obecné nanočásticím ZnO, dochází k jejímu úhynu v souvislosti s bioakumulací (růstem koncentrace nanočástic) v těle. Vystavení různým variacím Zn (ZnO nanočástice,  $Zn^{2+}$  ionty, mikro ZnO) ukázalo, že množství vstřebaného Zn v těle a bioakumulace je závislá na dávce. Pravděpodobně je bioakumulovaný Zn primárně uvolněn z nanočástic ZnO v podobě  $Zn^{2+}$ . Tato skutečnost by mohla naznačovat, že rozložitelnost nanočástic oxidů kovů je důležitou součástí toxického efektu. Studie toxicity na *Caenorhabditis* (půdní červ) ukázaly, že nanočástice ZnO mohou inhibovat růst a reprodukční schopnost buněk. [12]

Protože ZnO nanočástice jsou hojně používány v opalovacích krémech, bylo jedním z nejfrekventovanějších směrů zkoumání vystavení kůže nanočásticím ZnO. Cross a kol. studovali absorpci nanočástic ZnO. Když byla Franzova cela (difúzní komůrky využívané pro studium působení testované látky na kůži *in vitro*) vystavena opalovacímu krému s nano-ZnO na 24 hodin, nebyla sledována žádná známka penetrace ZnO nanočástic. Navíc elektronová mikroskopie ukázala, že nanočástice nejsou detekovány ani v nižších vrstvách *stratum corneum* (bezjaderné zploštělé buňky vnější vrstvy kůže) nebo životaschopné epidermis. Taktéž byly studovány způsoby vniknutí nanočástic ZnO ústy, vdechnutím, intratracheálním (dovnitř průdušnice) podáním. [52] Zheng a kol. testovali toxicitu sledováním vlivu nanočástic ZnO vpravených do trávicího traktu myši. Slezina a mozkové buňky byly beze změny, zatímco jiné primární orgány zahrnující srdce, plíce, játra a ledviny byly poškozeny. [53] Wang a kol. také zkoumali působení nanočástic ZnO

na myši. Ukázal, že patologické změny vyvolané ZnO nanočásticemi byly závislé na velikosti částic a velikosti dávky. Při podání přímo do plic byl pozorován závažný zánět plic, množení buněk a zesílení stěny plicních sklípků v plicích u všech pozorovaných myších. Všechny tyto změny bylo možné sledovat ve vyšší míře u zvířat, která obdržela vyšší dávku. [54]

Nanočástice ZnO vykazují silnou cytotoxicitu při nižších koncentracích a silnou adsorpční schopnost k proteinům, což může přispívat k jejich cytotoxicitě. [12] Brunner a kol. zjistili, že téměř všechny lidské i hlodavčí buňky odumřely po vystavení koncentraci 15 ppm. [55] Sharma uvedl, že nanočásticemi ZnO indukovaná cytotoxicita je závislá na koncentraci a době expozice. Další poškození byly způsobeny oxidačním stresem, který může být pozorován díky zvýšení hladiny hydroperoxidu, snížení hladiny glutathionu a snížení katalytické aktivity. Všechny tyto faktory přispívají k buněčné smrti. [56]

Studován byl také vliv tvaru a velikosti nanočástic na jejich toxicitu. Vliv velikosti a plochy povrchu ZnO nanočástic na jejich cytotoxicitu byl sledován na různých velikostech kulových nanočástic. Nehledě na velikost vykazují všechny rostoucí hydrodynamický průměr během prvních 12 hodin, poté ale klesá. Kromě toho kulovité nanočástice vykazují stabilnější velikost než tyčkovité. Bez ohledu na tvar nanočástic, menší částice agregují do menších sekundárních částic. Koncentrace, při které dojde k úhynu nebo imobilizaci 50 % vystavených organismů ( $EC_{50}$ ), byla stanovena pro R8 (nanočástice ZnO tyčinkovitého tvaru s velikostí 5-16 nm) a R19 (nanočástice ZnO tyčinkovitého tvaru s velikostí 16-48 nm) po expozici 72 hod na 4,6 a 8,2  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Pro kulové nanočástice ZnO S25 (velikost 36-68 nm) a S38 (velikost 50-122 nm) byla hodnota  $EC_{50}$  stanovena po expozici 72 hod na 10,7 a 11,9  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Bylo zjištěno, že částice o nano rozměrech jsou více toxické vůči rakovinným buňkám osteoblastů a vykazují větší antibakteriální aktivitu než odpovídající mikročástice ZnO. I když větší roli hraje sekundární velikost (velikost agregátů), určitý vliv má i primární velikost nanočástic. Menší velikosti tvoří relativně malé sekundární agregáty, které způsobují větší cytotoxicitu. Obecně menší částice mají větší kontakt s buňkami, tím i větší

možnost k jejich poškození. Velikostí povrchu lze také regulovat míru poškození buněk. Čím větší je specifický povrch tím větší cytotoxicita. [39]

Testujeme-li toxicitu pro dva různé typy tvarů, měly by mít podobnou, při nejlepším stejnou velikost povrchu, krystalinitu, primární a sekundární velikost. Například nanodrátky a nanočástice kulového tvaru s danými vlastnostmi. Po expozici 12 hod mají podobnou cytotoxicitu, po 24 hod má však nanodrátek větší toxicitu. Hodnota EC50 nanodrátku je  $8,5 \text{ ng.ml}^{-1}$  a nanočástice sférického tvaru je  $12,1 \text{ ng.ml}^{-1}$ . Anizotropní částice (např. vlákna) mohou způsobit větší dlouhodobé účinky jako je fibróza a rakovina plic. Předchozí studie ukázaly, že uhlíkové nanomateriály např. uhlíkové nanotrubičky jsou více toxické než uhlíková čern. Uhlíkaté nanotrubičky způsobují větší poškození DNA než kulovitý ZnO či TiO<sub>2</sub>. Vliv tvaru nanočástic na jejich toxicitu se odvíjí od počtu hran, které indukují oxidační stress a tedy od velikosti styčné plochy nanočástic s buněčnou membránou. [39]

## 1.5 Lipoperoxidace

Jednou z cest, kterými může ZnO způsobovat poškození organismu je peroxidace lipidů. Mezi lipidy se mimo jiné řadí polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) spadající pod skupinu vyšších monokarboxylových kyselin. Příkladem PUFA s dvojnými vazbami jsou kyselina linolová, linolenová a arachidonová.

Lipoperoxidace má enzymový nebo neenzymový průběh. Neenzymová lipoperoxidace je nekontrolovatelný děj degradace lipidů působením radikálů. Velký význam má u biologických membrán, které obsahují fosfolipidy s vysokým zastoupením polynenasycených mastných kyselin. [57]

Peroxidace lipidů probíhá jako řetězová reakce vedoucí k poškození buněčných membrán. U buněk tento proces probíhá zejména na polynenasycených mastných kyselinách obsahující dvojné vazby náchylné k peroxidaci. Jedná se radikálovou reakci probíhající ve třech základních krocích: iniciace, propagace a terminace. [58] Průběh peroxidace lipidů je dále uveden na modelové kyselině linolové.

K iniciaci lze použít jakoukoliv látku, která je schopna vytrhnout vodíkový atom z methylenové skupiny kyseliny linolové. Takovou schopnost mají například reaktivní formy kyslíku (např.  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ). Kyselina linolová se tímto způsobem mění na uhlíkový radikál. [58]



Vytržení vodíku způsobí změnu uspořádání dvojných vazeb v uhlovodíkovém řetězci kyseliny linolové. Vzniká konjugovaný dien s dvěma dvojnými vazbami oddělenými jednoduchou vazbou. Takováto látka se následně spojuje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu. [58]

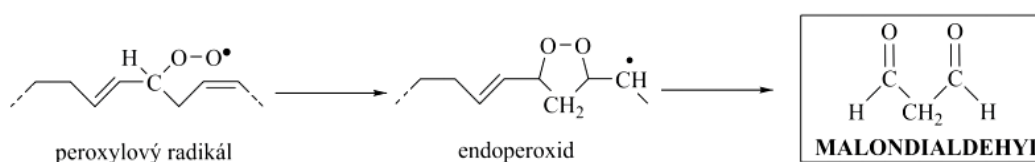


Propagace radikálové reakce probíhá díky schopnosti peroxylového radikálu vytrhnout elektron ze sousední mastné kyseliny, která se stane novým radikálem. Přitom se sám přemění na lipidový hydroperoxid. [58]



Terminace neboli ukončení řetězové reakce proběhne, setká-li se radikál kyseliny linolové s jiným radikálem nebo molekulou antioxidantu. [58]

Nedojde-li k vytrhnutí vodíku ze sousední mastné kyseliny peroxylovým radikálem, naváže se reaktivní kyslík na vlastní uhlovodíkový řetězec za současného roztržení dvojných vazeb. Vzniká endoperoxid (cyklický peroxid) z nějž se hydrolyzou vytváří vedlejší produkt lipoperoxidace – malondialdehyd (Obr. 6). [59]



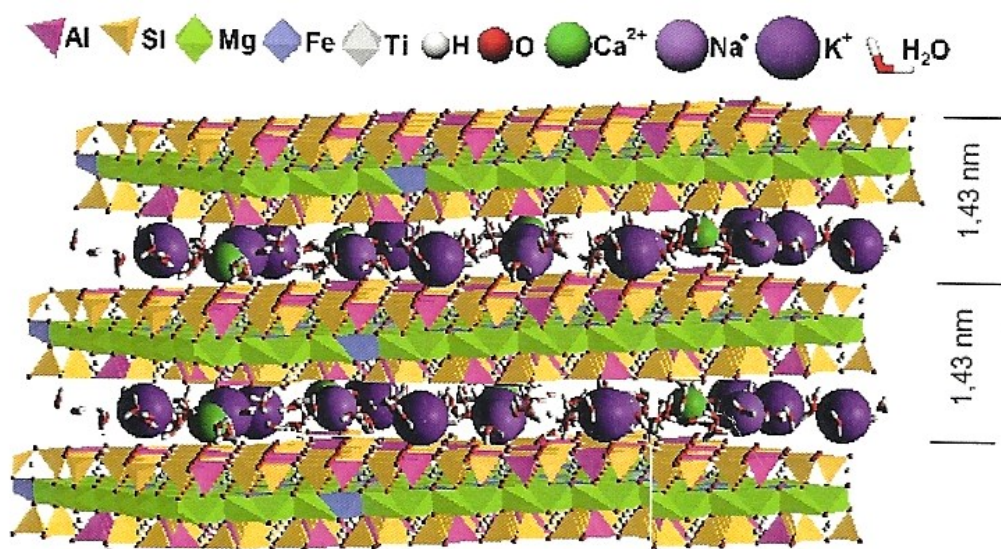
**Obr. 5:** Obecné schéma vzniku malondialdehydu z peroxylového radikálu. [59]



Během peroxidace lipidů vznikají různé vysoce reaktivní vedlejší produkty, jako jsou epoxidy, aldehydy, hydrokarbony. Tyto produkty mohou atakovat skupiny proteinů a přeměnit je na jiné sloučeniny. Při jejich vysokých koncentracích mohou působit cytotoxicky. [59]

## 1.6 Vermikulit

Vermikulit je přírodní jílový minerál, silikát s nábojem na vzorcovou jednotku přibližně 0,2-0,6. Konkrétní zařazení je ke skupině fylosilikátů (vrstevnaté silikáty) s nekonečnými dvourozměrnými sítěmi tetraedrů a oktaedrů. Tetraedrické sítě obvykle obsahují tetraedry  $[\text{SiO}_4]^{4-}$ ,  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  nebo  $[\text{FeO}_4]^{5-}$ . Oktaedrická síť je tvořena dvěma rovinami aniontů  $\text{O}^{2-}$  a  $\text{OH}^-$ , umístěnými v těsné blízkosti. Vermikulit má vrstevnatou strukturou typu 2:1 kde dvě sítě tetraedrů s opačnou polaritou jsou spojeny jednou sítí oktaedrů. Na ortogonální buňku připadá šest oktaedrů a osm tetraedrů. Prostor v místě, kde se setkávají dva povrchy rovin bazálních kyslíků tetraedrické sítě značíme jako mezivrstevní prostor. Obvyklým materiálem v mezivrsteví jsou hydratované výměnné kationy anorganických kovů  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ . V mezivrsteví se také vyskytují molekuly vody způsobující jeho podstatné rozšíření. S rostoucím zastoupením vody roste i mezivrstevní vzdálenost. [60]



**Obr. 6:** Model struktury vermikulitu z Brazílie. [60]

V souvislosti s vrstevnatou strukturou existují důležité procesy modifikace jako je interkalace, exfoliace a delaminace. Interkalace vyjadřuje proces přemístění atomů, iontů a molekul (hostů) do mezivrstevnatého prostoru (hostitele). Vlivem interkalace dochází k rozšíření mezivrstevních vzdáleností. Mezi hostem a hostitelem vznikají slabé vazebné síly zatímco interkalovaná sloučenina obsahuje pevné kovalentní vazby. Exfoliace vypovídá o stupni separace vrstev původního vrstevnatého silikátu v disperzi, rozpouštědle nebo polymerní matrici. Vznikají volné na sobě nezávislé orientované vrstvy. Delaminace je proces oddělování jednotlivých vrstev, ale za současného zachování uložení vrstev. [60]

Delaminace je užitečná chceme-li zvýšit velikost interagujícího povrchu. Interkalace i delaminace může podstatně změnit fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného nanokompozitu. Výsledné vlastnosti se odvíjí od koncentrace a druhu interkalovaných částic. Můžeme tak získat nanokompozit s antibakteriálními či fotokatalickými vlastnostmi. Výhodou interkalovaných nanočástic je upevnění na matrici, dochází tak k eliminaci uvolnění nanočástic do prostředí a zamezení toxických účinků. [60]

Holešová a kol. provedli *in vivo* analýzu toxicity vermikulitu a jeho vliv na trávicí trakt při jeho podání ústy. Testy probíhaly na několika různých savcích. Odebrané vzorky z tkání sliznice, jazyka, jícnu, žaludku, dvanáctníku, střeva a jater byly podrobeny přímému diagnostickému vyšetření. Ani u jednoho vzorku nebyla prokázána systémová ani lokální reakce, proto je toxický vliv vermikulitu na organismus savců nepravděpodobný. [61]

## 2 Experimentální část

Experimentální práce byla realizována v laboratořích Centra nanotechnologií (VŠB-TU Ostrava).

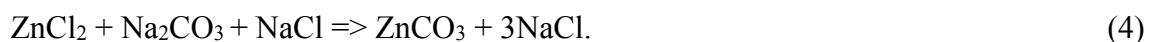
V první části experimentální práce byly mechanochemickou syntézou připraveny nanočástice oxidu zinečnatého (dále značeno ZnO) a částice nanokompozitů oxid zinečnatý/vermikulit (dále značeno ZnO\_V). V druhé fázi byly u těchto nanostruktur sledovány toxické účinky a porovnávány s komerčně dostupnými nanočásticemi oxidu zinečnatého (dále označeno ZnO/komerční).

Jako prekurzory pro přípravu byly použity chlorid sodný (Lachner,  $M = 58,44$  g/mol), bezvodý uhličitan sodný (Lachner,  $M = 105,99$  g/mol) a bezvodý chlorid zinečnatý (Lachner,  $M = 136,29$  g/mol). Pro přípravu kompozitního nanomateriálu byl přidán vermikulit ve dvou různých hmotnostních zastoupeních. Jednalo se o vermikulit (interní značení: 407/08) původem z Brazílie s velikostí částic pod 40  $\mu\text{m}$ . K promývání pomletého vzorku se použila destilovaná voda.

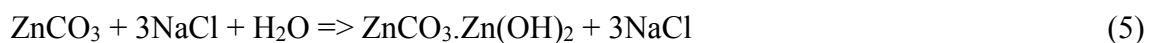
### 2.1 Mechanochemická syntéza

Obecně platí, že se jedná o mletí práškového materiálu, které zahrnuje snížení velikosti částic. Kontakt mezi mletými materiály je využit k výraznému zlepšení difúze a chemické reaktivity pevných látek. Nejběžnější zařízení, ve kterých se mechanochemická syntéza provádí, jsou vibrační, planetární a kulové mlýny. Liší se v kapacitě a účinnosti mletí [62] Tato metoda je využívána pro přípravu široké škály nanočástic zahrnující ZnS, CdS, ZnO,  $\text{LiMn}_2\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$  a  $\text{CeO}_2$  [63].

Mletí práškových prekurzorů vede k homogenizaci a vzniku prekurzorů budoucích nanočástic ZnO a kompozitního nanostrukturovaného materiálu na bázi ZnO. V průběhu mletí prekurzory reagují a vytváří směs oddělených nanokrystalů požadované fáze. To vše probíhá vždy za přítomnosti rozpustné soli. U použitých prekurzorů dojde k separaci nanočástic díky NaCl, [63] Při ideálním průběhu vzniku nanočástic ZnO mletím v planetárním kulovém mlýně dochází k reakci:



Odstranění přítomného NaCl se provádí promýváním destilovanou vodou. Reakci probíhající ve vodě lze popsat reakcí:



Pro konečný vznik nanočástic ZnO se vzorek kalcinuje, kdy průběh lze popsat reakcí [64]:



### 2.1.1 Příprava částic ZnO

Nanočástice byly připravovány v planetovém kulovém mlýnu s označením FRITSCH premium line, pulverisette 7. Dalším použitým přístrojem byla odstředivka Ependorf, sušárna Memmert a kalcinační pec LAX. Pro práci se vzorky byly využity pomůcky: achátová třecí miska s tloučkem, kalcinační miska, váženky, nerezová lžička, kádinky, Petriho misky a skleněná tyčinka.

Nejprve bylo naváženo 5 g každého z prekurzorů a převedeno do kádinky. Takto byly připraveny dva 15g vzorky. Zhomogenizované vzorky, byly převedeny do dvou mlecích nádob. Každá obsahovala tři mlecí kuličky. Po vložení těsnění, uzavření nádob a vložení do planetového kulového mlýnu, byly nastaveny parametry mletí. Rychlost mletí 400 otáček za minutu, doba mletí 15 minut a průběh jedním cyklem. Pro odstranění chloridových iontu byl vzorek promýván. Do vzorku byla přidána voda, roztok byl promíchán a odstředěn. Přítomnost chloridových iontů byla určena pomocí indikačních papírků. Po promytí, byl vzorek na Petriho miskách sušen v sušárně po dobu 24 hodin při teplotě 75°C. Vysušený vzorek byl třen v achátové misce do podoby jemného prášku. Takto zpracovaný byl v kalcinační misce kalcinován na 350°C a 650°C po dobu 1,5 hodiny. Kalcinované vzorky byly znovu třeny v achátové misce do vytvoření jemného prášku. Pro další práci byly tyto vzorky označeny M/ZnO/350 a M/ZnO/650.

### **2.1.2 Příprava kompozitního nanomateriálu ZnO/vermikulit s rozdílným koncentračním zastoupením nanočástic ZnO**

Kompozitní nanomateriál byl připraven ve dvou koncentračních zastoupeních. Pro první vzorek bylo použito 5 g NaCl, 5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 g ZnCl<sub>2</sub> a 2 g vermikulitu. Takto byly připraveny dva sedmnáctigramové vzorky o nižší koncentraci vermikulitu. Pro druhé vzorky s vyšším koncentračním zastoupením vermikulitu, bylo použito 2,5 g NaCl, 2,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,5 g ZnCl<sub>2</sub> a 2 g vermikulitu. Byly připraveny dva 9,5 gramové vzorky o stejných hmotnostech prekurzorů. Postup zpracování byl stejný pro nižší i vyšší koncentraci.

Navážené zhomogenizované vzorky v kádince byly převedeny do mlecích nádob, kde v každé byly tři mlecí kuličky. Před uzavřením nádob bylo vloženo těsnění. Vzorky se mlely 15 minut při 400 otáčkách za minutu, jedním cyklem. Pomleté vzorky byly dále promývány do odstranění chloridových iontů. Průběh promývání byl započat přidáním destilované vody ke vzorku, dále homogenizováním roztoku, vložení do odstředivky (3 minuty, 4000 ot/min) a slitím vody nad sedimentem. Vzorky zbavené chloridových iontů byly umístěny do sušárny na 24 hodin při teplotě 75°C. Vysušený vzorek byl třen v třecí misce a vzniklý jemný prášek se kalcinoval na 350°C a 650°C. Náběh kalcinace byl 1,5 hodiny, výdrž 1,5 hodiny. Kalcinované vzorky se znovu rozetřely v třecí misce.

Vzorky s nižším hmotnostním zastoupením vermikulitu byly označeny M/ZnO/1V/350 a M/ZnO/1V/650. Vzorky s vyšší koncentrací vermikulitu pak M/ZnO/2V/350 a M/ZnO/2V/650. Hodnota 650 a 350 je označení pro teplotu, při které byl vzorek kalcinován.

## **2.2 Charakterizace vzorků**

### **2.2.1 Rentgenová difrakční analýza**

Pro fázovou analýzu připravených experimentálních vzorků byl použit rentgenový práškový difrakční analyzátor Rigaku Ultima IV v Bragg-Brentanovém uspořádání a s použitím Cu-lampy. Analyzované práškové vzorky byly nanесeny na sklíčko s prohlubní a měřeny při konstantních podmínkách 40kV, 40mA, rozsah 2-70° 2 $\theta$ , rychlost měření 3,8°/min.

Podstata rentgenové difrakční analýzy krystalové struktury je založena na ozáření vzorku monochromatickým svazkem rentgenového záření. Svazek se při dopadu pružně rozptyluje na elektronech měřeného vzorku. Vzniká sekundární difraktované záření, které zachycuje detektor. Z difrakčního obrazu krystalu lze určit fázovou strukturu. Z poloh difrakcí stanovujeme rozměry elementární buňky. [65] Difrakci rentgenového záření lze popsat jako odraz na rovinách krystalu pomocí Braggovy rovnice (1).

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (7)$$

Svazek rovnoběžných paprsků rentgenového záření o vlnové délce  $\lambda$ , dopadá na mřížkovou rovinu pod difrakčním úhlem  $\theta$  a pod stejným úhlem se i odráží. Vzdálenost mřížkových rovin vyjadřuje  $d$  a  $n$  je řád difrakce. [66]

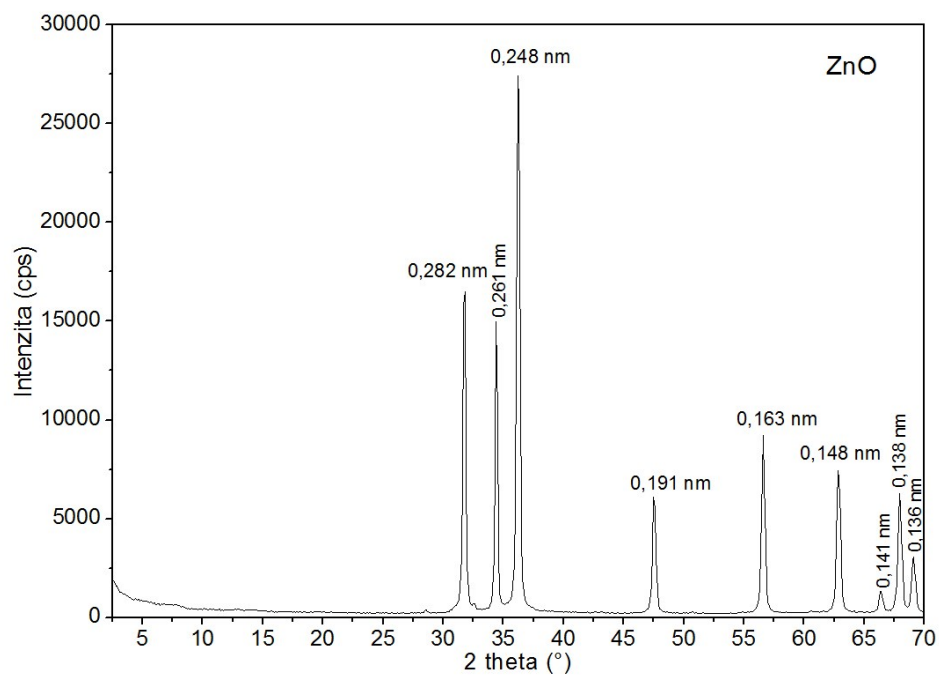
Pro stanovení velikosti krystalitů práškového vzorku lze použít Scherrerovu rovnici (5), která popisuje závislost šířky píku na velikosti krystalitů  $L_c$ .

$$L_c = \frac{k \cdot \lambda_{CuK\alpha}}{\beta \cdot \sin \theta} \quad (8)$$

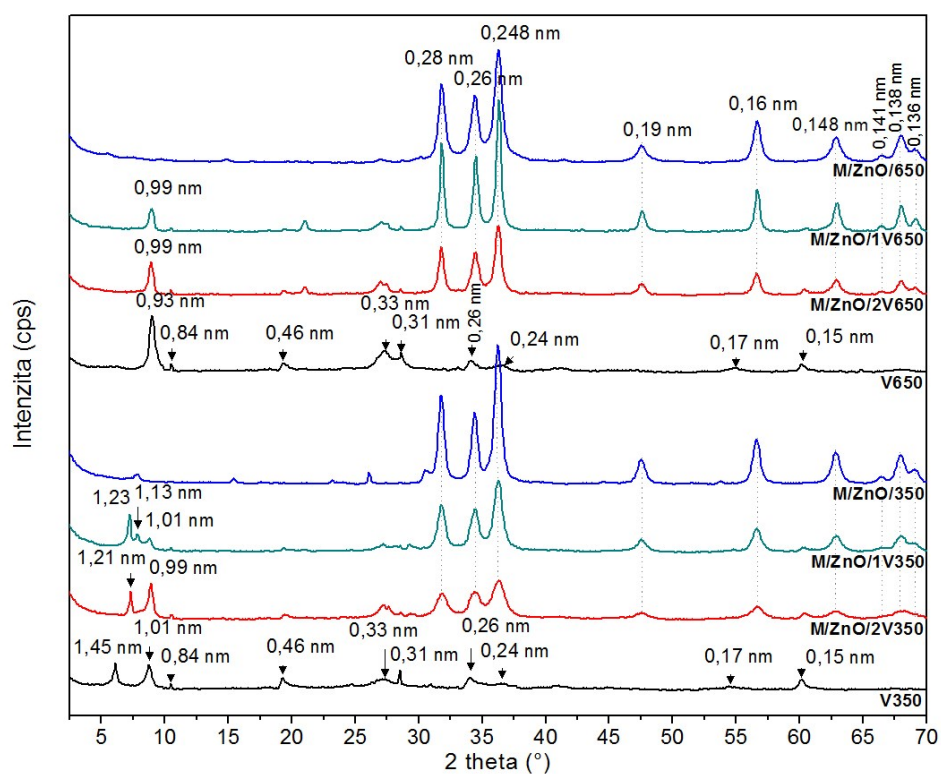
Scherrerova konstanta  $k$  je závislá na typu materiálu, pro náš případ byla použita hodnota 0,9 charakteristická pro dobře krystalické látky. Vlnová délka použitého záření  $\lambda_{CuK\alpha}$  je rovna 1,5405 Å. Úhel  $\theta$  je hodnota, pod kterou dochází k difrakčnímu maximu. Pološířka  $\beta$  maxim difrakčního profilu v hodnotách  $\theta$  se vypočte ze vzorce

$$\beta = \sqrt{B^2 + b^2} \quad (9)$$

kde  $B$  je experimentální pološířka difrakce vzorku a  $b$  je pološířka velmi dobře krystalického standardu ( $b = 0,105^\circ 2\theta$ ). [67]



**Obr. 7:** Rentgenový difrakční záznam experimentálního vzorku ZnO/komerční.



**Obr. 8:** Rentgenové difrakční záznamy experimentálních vzorků.

Na Obr. 7 a Obr. 8 jsou zobrazeny difrakční záznamy jednotlivých experimentálních vzorků. ZnO/komerční má podstatně vyšší intenzity píků, proto je uveden zvlášť. Polohy píků jsou shodné s vzorky M/ZnO/350 a M/ZnO/650.

Při porovnání rentgenového difrakčního záznamu vermikulitu kalcinovaného při 350°C (V350) s vermikulitem kalcinovaným při 650°C (V650), jde vidět většinou výskyt píků na stejných polohách pouze s rozdílnými intenzitami. Hlavní rozdíl je u oblasti píků  $5 - 10^\circ 2\theta$ . Pro vermikulit jsou charakteristické píky 1,45 nm, 1,01 nm, 0,46 nm, 0,31 nm, 0,26 nm, 0,24 nm, 0,17 nm, 0,15 nm. Reflexe s hodnotou  $d(060) = 0,15$  nm odpovídá trioktahedrál ní struktuře vermikulitu. [68] Pík 1,45 nm odpovídá hydratované struktuře a pík 1,01 nm částečně dehydratované struktuře. Reflexe s hodnotami 0,84 nm, 0,33 nm a 0,31 nm jsou význačné pro příměs tremolit. Důsledkem teploty kalcinace při 650°C dochází u V650 k úplné dehydrataci a tedy k vymizení píku charakteristického pro vermikulit s hodnotou mezivrstevní vzdálenosti  $d(002) = 1,45$  nm. Pro dehydratovanou strukturu je charakteristický pík 0,93 nm.[69]

Práškové vzorky oxidu zinečnatého (M/ZnO/350 a M/ZnO/650) se vyznačují třemi charakteristickými píky 0,28 nm, 0,26 nm a 0,248 nm, které snižují svou intenzitu se zvyšující se teplotou kalcinace. U vzorků M/ZnO/1V/350 a M/ZnO/2V/350 proběhla parciální interkalace ZnO do mezivrstev vermikulitu. Projevem této částečné interkalace je posun píku 1,45 nm na nižší hodnotu 1,21 nm nebo 1,23 nm. U vzorků M/ZnO/1V/650 a M/ZnO/2V/650 dochází k posunu píku oproti V650 doleva z hodnoty mezirovinné vzdálenosti 0,93 nm na hodnotu 0,99 nm. Posun je dán parciální interkalací ZnO do vermikulitové struktury.

**Tab. 1:** Hodnoty mezirovinných vzdáleností  $d$  a Millerovy indexy difrakčních píků částic oxidu zinečnatého (ZnO).

ZnO	$d$ [nm]	0,28	0,26	0,248	0,19	0,16	0,148	0,141	0,138	0,136
	(hkl)	100	002	101	102	110	103	200	112	201



Byla stanovena velikost krystalitů ZnO u jednotlivých vzorků podle výše uvedené Scherrerovy rovnice (5). Největší velikost krystalitů vykazoval vzorek M/ZnO/1V/650 a nejmenší vzorek M/ZnO/2V/350. U čistého ZnO platí, že se zvyšující teplotou kalcinace klesá velikost krystalitů, zatímco u ZnO na vermikulitové matrici se vyskytuje pravidlo, se zvyšující se teplotou kalcinace roste velikost krystalitů. Dále lze vypočítat závislost na obsahu vermikulitové matrice. Se snižujícím se hmotnostním procentem vermikulitu, roste velikost krystalitů. Největší krystalinitu vykazoval ZnO/komerční. (Tab. 2)

**Tab. 2:** Naměřené hodnoty mezirovinných vzdáleností  $d$ , jim příslušejí úhly  $2\theta$  a experimentální pološířka difrakce. Vypočítané hodnoty velikosti krystalitů  $L_c$  ZnO experimentálních vzorků.

	$d$ [nm]	$2\theta$ [°]	$B$ [°]	$L_c$ [nm]
ZnO/komerční	0,28186	31,740	0,1180	78,149
M/ZnO/350	0,28186	31,719	0,2570	32,825
M/ZnO/650	0,28138	31,776	0,2955	28,402
M/ZnO/1V/350	0,28143	31,770	0,3440	24,294
M/ZnO/1V/650	0,28118	31,798	0,1745	49,633
M/ZnO/2V/350	0,28150	31,760	0,4850	17,129
M/ZnO/2V/650	0,28163	31,746	0,2270	37,396

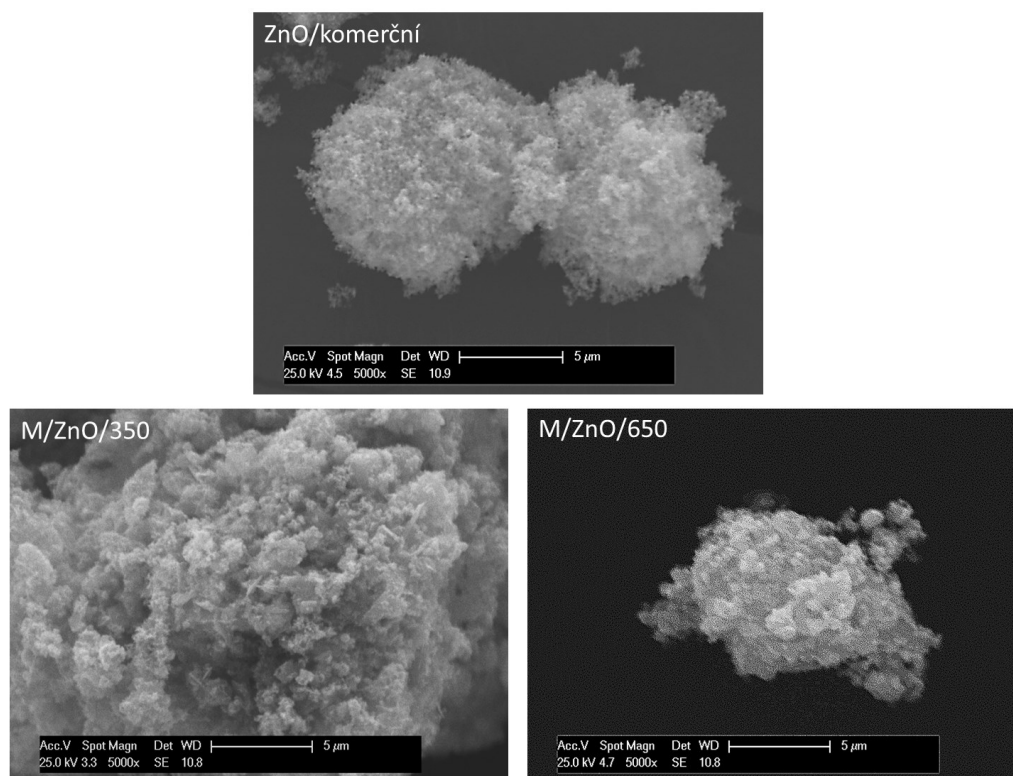
### 2.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro charakterizaci vzorků byl použit skenovací elektronový mikroskop PHILIPS XL-30 s rentgenovým spektrometrem. Vzorky byly připevněny na uhlíkovou pásku a následně naprášeny zlatem ve vakuové naprašovačce POLARON SC 7640. Pro každý vzorek byly pořízeny vždy dva snímky v měřítku  $5 \mu m$  a dva v měřítku  $10 \mu m$ . Analýza pomocí EDAX (energieově disperzní mikroanalýzátor) byla provedena pro každý snímek uprostřed a na hraně částice. Snímky byly pořízeny s využitím sekundárních elektronových svazků.

Jedná se o analytickou metodu vytvářející obraz povrchu vzorku postupně po řádcích. Od toho se odvíjí název rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie.

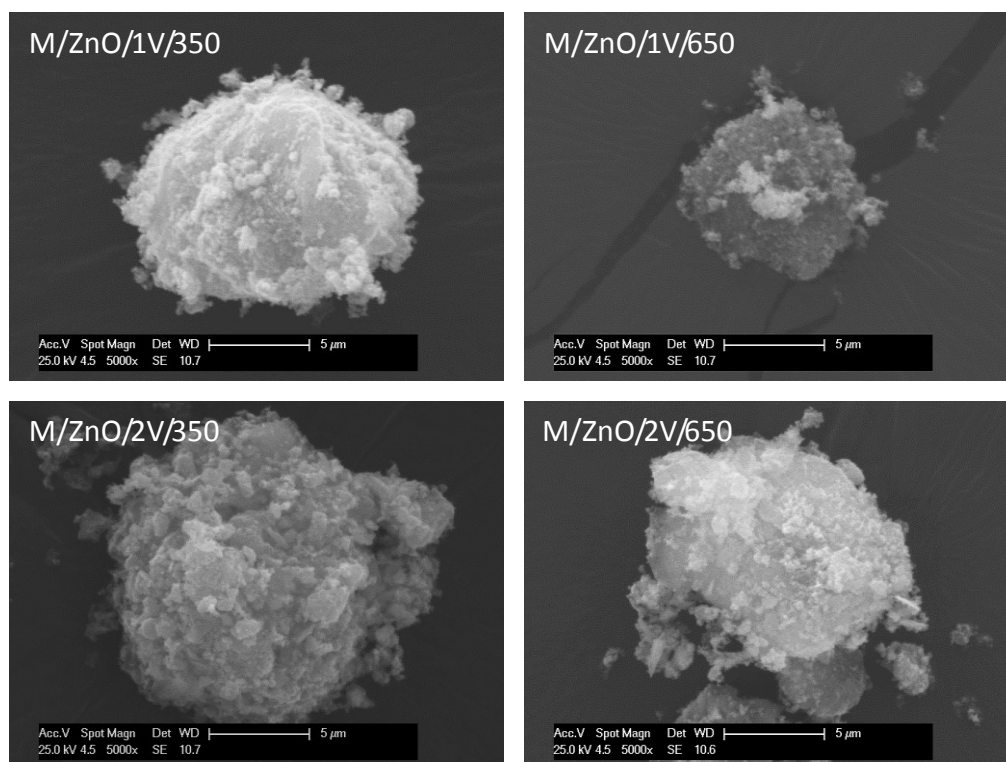
Elektronový svazek prochází skrz elektromagnetické čočky, které pomocí magnetického pole vytvořeného cívkou usměrňují elektrony na určité místo na vzorku. Elektrony interagují s atomy vzorku za uvolnění sekundárních elektronů, zpětně odražených elektronů, charakteristického a spojitého rentgenového záření. Elektrony jsou přijímány detektorem a zaznamenaná data jsou zpracována za účelem vytvoření ostrého obrazu povrchu vzorku. K analýze složení vzorku je možno připojit energiově disperzní analyzátor. [70] Kdy pomocí urychlených elektronů dochází k vyražení elektronu z vnitřní elektronové slupky atomu vzorku. Vzniklá vakance je zaplněna elektronem z vnější elektronové slupky za vyzáření charakteristického rentgenového záření. Z charakteristického spektra lze zjistit, jaké atomy jsou v daném místě přítomny. Metoda je vhodná hlavně ke stanovení přítomnosti těžších prvků ve vzorku. [66]

Snímky (Obr. 9) porovnávající komerční oxid zinečnatý (ZnO/kom) a mechanochemicky připravený oxid zinečnatý (M/ZnO/350 a M/ZnO/650) ukazují tendenci všech vzorků vytvářet aglomeráty nanočástic. Ze snímků jde vidět větší meziprostory aglomerátya menší velikost částic ZnO/kom oproti vzorku M/ZnO/650 a M/ZnO/350 ze kterých se shluky skládají. Mechanochemicky připravené ZnO má tendenci vytvářet malé šupinky, které jsou způsobeny mletím v kulovém mlýně a nedostatečným rozetřením v třecí misce.



**Obr. 9:** Snímky experimentálních vzorků ZnO/komerční, M/ZnO/350 a M/ZnO/650.

U snímků (Obr. 10) vzorků oxidu zinečnatého navázaného na vermikulitovou matici lze vidět vrstevnatou strukturu vermikulitu a různorodé krystaly nanočástic ZnO na povrchu vermikulitu. Primárně dochází ke krystalizaci ZnO na hranách, sekundárně pak na plochách vermikulitové matrice. Při nižším hmotnostním zastoupení nanočástic ZnO (M/ZnO/1V/350 a M/ZnO/2V/350) dochází k lepší krystalizaci jak na hranách, tak na plochách vermikulitové matrice. Při vyšším zastoupení nanočástic ZnO (M/ZnO/1V/650 a M/ZnO/2V/650) dochází převážně ke krystalizaci na plochách. Vzorky kalcinované při 650 °C utváří ploché vermikulitové útvary, na kterých má ZnO vysokou tendenci krystalizovat a utvářet aglomeráty. Nejvyšší schopnost krystalizovat na plochách vykazoval vzorek M/ZnO/1V/650.



**Obr. 10:** Snímky experimentálních vzorků M/ZnO/1V/350, M/ZnO/1V/650, M/ZnO/2V/350 a M/ZnO/2V/650.

**Tab. 3:** Zastoupení jednotlivých prvků ve vzorcích určené pomocí EDAX.

vzorek	bod	[w%]						
		O	Mg	Al	Si	K	Fe	Zn
M/ZnO/1V/350	1	30,15	1,21	0,99	2,01	-	0,74	23,73
	2	25,19	0,31	0,15	0,51	-	0,46	22,02
M/ZnO/1V/650	1	32,47	0,40	0,14	1,20	-	0,69	14,90
	2	29,74	1,11	0,59	1,46	-	0,61	9,04
M/ZnO/2V/350	1	35,68	1,29	0,68	1,79	-	0,77	16,06
	2	27,59	0,54	0,45	1,24	-	0,69	15,58
M/ZnO/2V/650	1	34,73	2,35	1,58	4,58	0,74	1,51	10,61
	2	28,99	0,77	0,34	1,77	0,29	1,06	9,41

Výsledky prvkové analýzy prokázaly výskyt kyslíku (O) a zinku (Zn) reprezentující oxid zinečnatý (ZnO). Přítomnost dalších prvků jako je Mg, Al, Si, K, Fe odpovídající

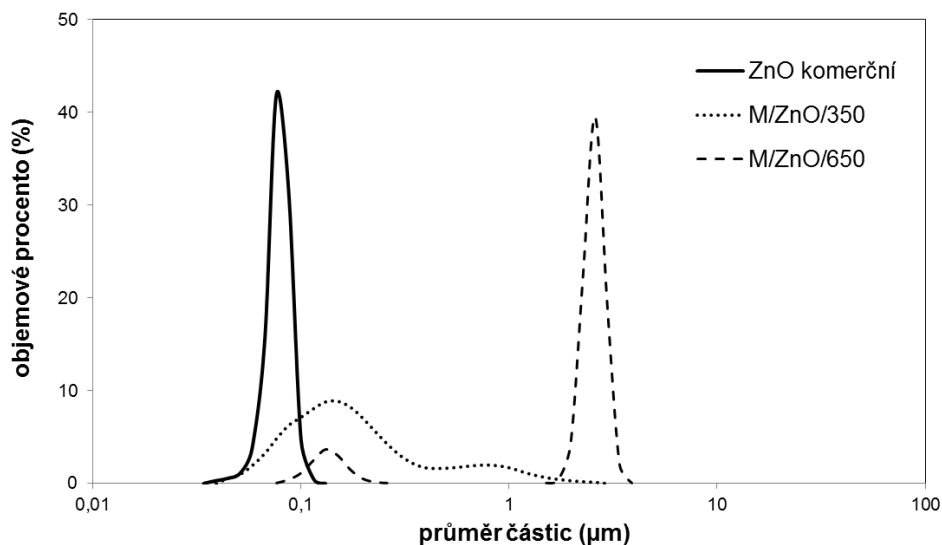
prvkovému složení vermikulitové matrice. V některých místech byla naměřena přítomnost vápníku, což vypovídá o malém množství příměsi minerálu tremolitu ve vermikulitu. Výskyt draslíku a vápníku ve vermikulitové matici se liší podle konkrétního místa naměření, obecně je vysoce malý, tak, že není v některých místech ani měřitelný. Hmotnostní zastoupení jednotlivých prvků je uvedeno v Tab. 2. Bod 1 označuje místo měření na ploše a bod 2 na hraně částice.

### **2.2.3 Distribuce velikosti částic**

Ke měření byl použit laserový difrakční analyzátor HORIBA LA-950 se dvěma zdroji modrého a červeného světla s krátkou vlnovou délkou.

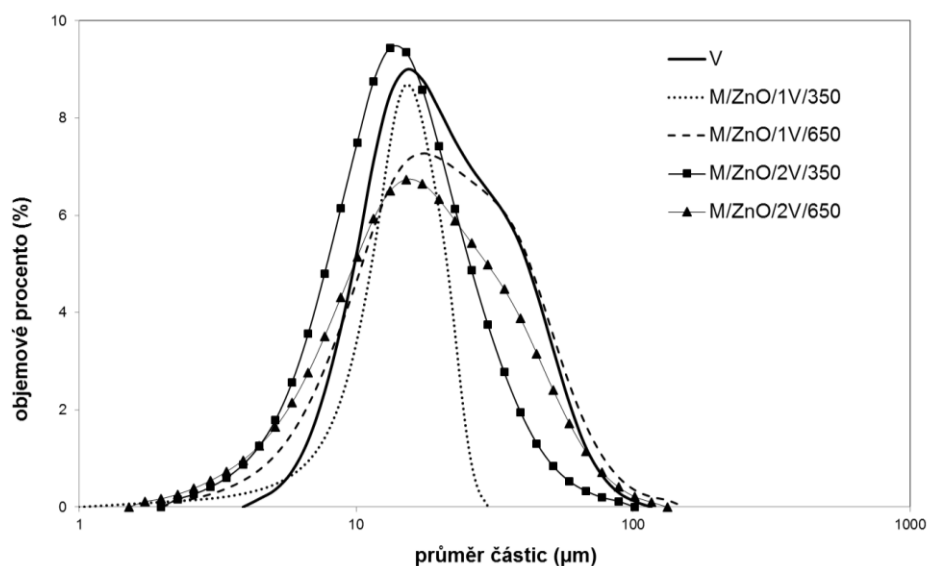
Laserová difrakční metoda využívá schopnosti různě rozptylovat laserový svazek v prostředí s tuhými částicemi v závislosti na jejich velikosti. Se snižující se velikostí částic se úhel difrakce (ohybu) zvětšuje a jeho intenzita se snižuje. Naopak se zvětšující se velikostí se úhel difrakce snižuje a roste intenzita. Vzniklý difrakční obrazec je digitalizován. Získaná data jsou zpracována a matematicky převedena na hodnoty charakterizující výslednou distribuci velikosti částic, za předpokladu kulovitěho tvaru částic. [71, 72]

Komerční vzorek vykazoval úzkou distribuční křivku v rozmezí velikosti částic 0,039 – 0,115  $\mu\text{m}$ , kdy největší četnost velikosti částic patřila hodnotě 0,076  $\mu\text{m}$ . Podstatně širší rozsah velikostí částic vykazoval experimentální vzorek M/ZnO/350. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 0,44 – 0,599  $\mu\text{m}$  s největší četností průměru částic 0,15  $\mu\text{m}$ . Experimentální vzorek M/ZnO/650 měl dvě maxima a to v rozmezí 0,087 – 0,226  $\mu\text{m}$  a 1,729 – 3,409  $\mu\text{m}$ . Největší četnost částic připadala na hodnotu 2,599  $\mu\text{m}$ . Z uvedených hodnot vyplývá, že mechanochemicky připravené nanočástice ZnO mají obecně vyšší velikost částic, než komerčně připravený ZnO a se vzrůstající teplotou kalcinace roste tendence částic aglomerovat. (Obr. 11)



**Obr. 11:** Distribuce velikost částic vzorků ZnO/komerční, M/ZnO/350 a M/ZnO/650.

Průměrná velikost nanokompozitů byla stanovena v intervalech od 0,72  $\mu\text{m}$  ( $d_{10}$ ) do 39,05  $\mu\text{m}$  ( $d_{90}$ ) se střední průměrnou hodnotou 18,43  $\mu\text{m}$  ( $d_{43}$ ). Vzorky M/1V/ZnO/350 a M/2V/ZnO/350 vykazovaly velmi úzkou distribuci velikosti částic v porovnání se vzorky M/1V/ZnO/650, M/2V/ZnO/650 a maticí vermikulitu. Širší distribuce částic vypovídá o tendenci aglomerovat. (Obr. 5)



**Obr. 12:** Srovnání výsledků distribuce velikost částic vzorků M/ZnO/1V/350, M/1V/ZnO/650, M/2V/ZnO/350, M/2V/ZnO/650 a vermikulitu (V).

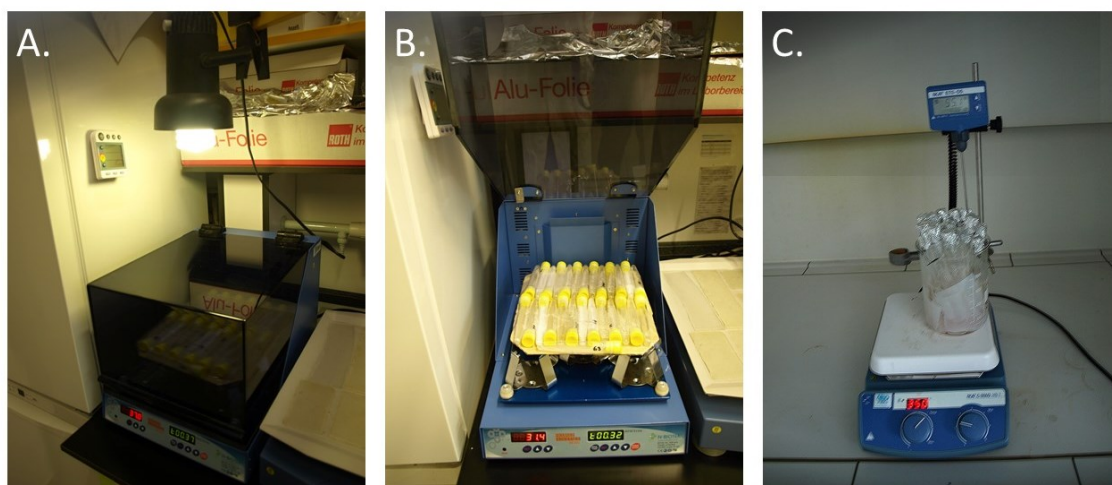
### 2.3 Testy toxicity

Pro testování toxicity připravených materiálů i komerčního vzorku byl zvolen postup, založený na určení schopnosti materiálů indukovat oxidativní stres cestou peroxidace lipidů, které jsou základní stavební jednotkou buněčných membrán.

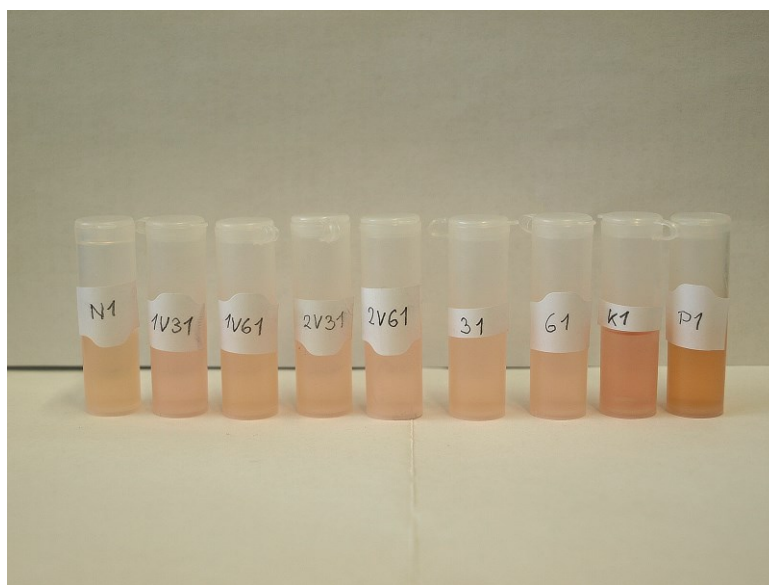
Testy byly prováděny 4 krát v tripletu, aby byl eliminován vliv hrubé chyby na výsledky. Jako negativní kontrola vystupovala micelární disperze kyseliny linolové bez přídavku vzorku. Pozitivní kontrola byla zvolena tak, aby měla známé toxické účinky na organismus a převyšovala svojí absorbancí veškeré experimentální vzorky. To splňuje použitý oxid titaničitý s průměrnou velikostí částic 21 nm, který byl využit jako standart v publikaci Corazzari a kol. [73], která byla základem pro zavedení a optimalizaci postupu.

Bylo naváženo vždy 9 mg všech vzorků i  $\text{TiO}_2$  (pozitivní kontrola) do plastových zkumavek kónického tvaru. Pro negativní kontrolu byly tři zkumavky ponechány bez vzorku. Do všech byly přidány 3 ml pufrované (0,01 M fosfátový pufr, pH 7,4) micelární disperze kyseliny linolové (0,001 M), která obsahuje 2,5 hm. % ethanolu. Zkumavky byly uzavřeny vršky, utěsněny parafilmem a vortexovány cca 10 s (IKA VORTEX GENIUS 3), pro dokonalé rozmíchání testovaného materiálu. Takto připravené byly následně upevněny v inkubátoru (NB – 205, N-BIOTEX), kde byly inkubovány 72 hodin při kontinuálním míchání (200 otáček/min) a osvětlu lampou (žárovka ReptiGlo 5.0 Compact, 26 W) (Obr. 13 A, B). Po uplynutí inkubace bylo do všech zkumavek připipetováno 0,1 ml butylhydroxytoluenu (0,2 hm. %) pro zastavení reakce. Roztoky ve zkumavkách byly vortexovány přibližně 2 s. Z každého roztoku bylo odpipetováno 1,5 ml do eppendoffových centrifugačních zkumavek a ty vloženy do centrifugy na 30 minut při 14000 otáčkách za minutu (MIKRO 120, Hettrich Zentrifugen). 1 ml roztoku nad usazeninou byl převeden do skleněných zkumavek a přidány 2 ml roztoku kyseliny thiobarbiturové (0,034 M), která je rozpuštěna ve směsi HCl (0,25 M) a kyseliny trichloroctové (0,92 M). Zkumavky zakryté alobalem byly inkubovány ve vroucí vodní lázni při teplotě 90 – 100 °C po dobu 30 minut (míchačka s termostatem IKA C-MAG HS7, digitální teploměr IKA ETS-D5). Varem roztoky zrudověly s různou intenzitou

zabarvení (Obr. 14), což svědčí o vzniku komplexu malondialdehyd – kyselina thiobarbiturová. Ke zchlazeným roztokům v ledové lázni bylo následně přidáno vždy po 3 ml 1-butanolu. Roztoky byly cca 10 s vortexovány, aby byl barevný komplex extrahován do organické fáze. Po rozdělení fází byla vždy odebrána pomocí kapátek horní růžová organická fáze do ampulek (Obr. 14). Tyto roztoky byly analyzovány spektrofotometrem (CINTRA 303) při vlnové délce záření 532 nm.



**Obr. 13:** Test toxicity: **A.** inkubátor při osvit lampou, **B.** ukázka upevnění vzorků v inkubátoru, **C.** var experimentálních vzorků na míchačce s termostatem.



**Obr. 14:** Experimentální vzorky po testu toxicity – rozdílná zbarvení roztoků.



### 2.3.1 UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie je fyzikálně-chemická metoda, která měří schopnost látek absorbovat záření v rozmezí vlnových délek 200-800 nm. Schopnost absorbovat záření závisí na množství absorbujících částic a na tloušťce absorbujícího prostředí. Absorbance se obvykle měří v absorpčním maximu absorbující látky. Měřením získáváme závislost absorbance na vlnové délce. [74]

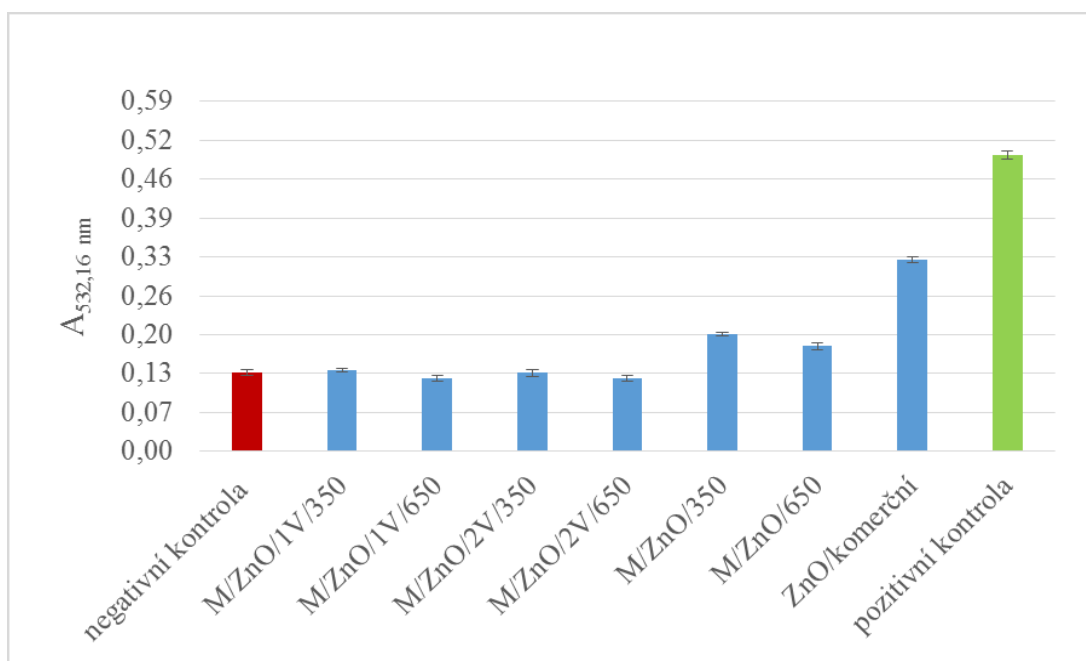
Jako zdroj je použita halogenová wolframová lampa. Viditelné světlo použité k ozařování je rozděleno na vlnové délky pomocí monochromátoru. Vzorek se postupně ozařuje monochromatickým zářením určitých vlnových délek, které se ve vzorku absorbují v závislosti na typu látek přítomných ve vzorku. Spektrofotometry lze rozdělit na dvoupaprskové a jednopaprskové. Pro měření byl použit dvoupaprskový spektrofotometr s děličem paprsků. Záření je rozděleno do dvou paprsků, kdy jeden prochází srovnávací kyvetou obsahující rozpouštědlo (v našem případě 1-butanol) a druhý paprsek prochází kyvetou se vzorkem v rozpouštědle. Prošlé záření se měří pomocí detektorů, které prošlé záření přemění na elektrický signál. Získaná spektra se následně od sebe odečítají. [75, 76]

Výsledky veškerých provedených testů vykazovaly shodný průběh. Na následujícím obrázku (Obr. 15) je znázorněn graf závislosti absorbance na typu vzorku. Tabulka (Tab. 4) pak ukazuje naměřené hodnoty a odpovídající hodnoty relativní odchylky a to vždy pod 5 %. Experimentální vzorky, obsahující vermikulitovou matici nevykazují při zahrnutí směrodatné odchylky schopnost peroxidace lipidů, protože hodnoty absorbance odpovídají hodnotě, která byla naměřena u negativní kontroly. Přítomnost vermikulitové matrice ve vzorcích tedy pravděpodobně vede k výraznému poklesu případných toxických účinků kompozitu. Komerční ZnO a mechanochemicky připravené vzorky ZnO naopak schopnost peroxidovat lipidy vykazují. Při porovnání vzorků dochází k nárůstu absorbance u vzorku M/ZnO/350 oproti M/ZnO/650. Vzhledem k zjištěné distribuci velikosti částic tento nárůst toxicity pravděpodobně odpovídá vysoké tendenci nanočástic ZnO aglomerovat při teplotě kalcinace 650 °C, kdy nejvíce zastoupená velikost ve vzorku M/ZnO/350 je 0,15 µm a M/ZnO/650 2,599 µm. Komerční ZnO

vykazuje ze zkoumaných vzorků nejvyšší schopnost peroxidovat lipidy, je tedy v tomto smyslu silné oxidační činidlo v procesu lipoperoxidace. Vzhledem k nejvíce zastoupené velikosti 0,076  $\mu\text{m}$  v komerčním ZnO se potvrzuje předpoklad závislosti toxicity na velikosti částic s tím, že s rostoucí velikostí se toxicita snižuje. Aglomerace je tedy jedním ze zásadních faktorů, které ovlivňují toxicitu. Z výše provedené literární rešerše vyplývá, že k uvolňování  $\text{Zn}^{2+}$  iontů dochází především při nižších hodnotách pH. Protože při samotném testování, bylo pH roztoku udržováno fosfátovým pufrům ve fyziologických hodnotách (tedy kolem pH 7,4), nebyly pravděpodobně  $\text{Zn}^{2+}$  ionty uvolňovány a tento mechanismus toxicity se neuplatnil.

**Tab. 4:** Tabulka naměřených hodnot absorbance  $A_{532,16}$  při vlnové délce 532,16 nm, jejich průměrná hodnota  $A_{532,16}$  a relativní odchylka  $\delta$ .

	Hodnoty $A_{532,16 \text{ nm}}$ vzorků			Průměrná $A_{532,16 \text{ nm}}$	$\delta$ [%]
	1	2	3		
negativní kontrola	0,13988	0,12940	0,12654	0,13194	4,4
M/ZnO/1V/350	0,13918	0,13586	0,13170	0,13558	2,3
M/ZnO/1V/650	0,12761	0,11758	0,12065	0,12195	3,4
M/ZnO/2V/350	0,12492	0,13895	0,13147	0,13178	4,4
M/ZnO/2V/650	0,12773	0,12472	0,11537	0,12261	4,3
M/ZnO/350	0,19564	0,20044	0,19236	0,19615	1,7
M/ZnO/650	0,16896	0,18323	0,17554	0,17591	3,3
ZnO/komerční	0,31805	0,32631	0,31472	0,31969	1,5
pozitivní kontrola	0,49367	0,50489	0,48826	0,49560	1,4



**Obr. 15:** Absorbance experimentálních vzorků naměřené při vlnové délce 532,16 nm ve srovnání s negativní a pozitivní kontrolou.

### 3 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo sledování schopnosti komerčně získaného ZnO a experimentálně připravených nanostrukturovaných materiálů na bázi oxidu zinečnatého, indukovat peroxidaci lipidů, která je jedním z markerů oxidativního stresu. Nanostrukturované materiály na bázi oxidu zinečnatého byly připraveny mechanochemickou syntézou. Studované vzorky byly charakterizovány rentgenovou difrakční analýzou, skenovací elektronovou mikroskopií s energiově disperzní analýzou, dále byla analyzována velikost částic a distribuce velikosti částic.

Testy toxicity potvrdily netoxický charakter částic nanokompozitů na bázi oxidu zinečnatého/vermikulit. Vzhledem k malým rozdílům je možné konstatovat nezávislost toxicity na poměru obsahu oxid zinečnatý/vermikulit, ve zkoumaných případech. Vzhledem k této skutečnosti je předpokládáno možné komerční využití takto připravených nanokompozitů. Mechanochemicky připravené vzorky nanočástic oxidu zinečnatého vykazovaly oproti komerčně získaným nanočásticím nízkou míru toxicity. Bylo zjištěno, že se zvyšující se teplotou kalcinace roste schopnost aglomerace a tím dochází k poklesu toxicity nanočástic oxidu zinečnatého. Nejvyšší toxicitu vykazoval komerčně získané nanočástice oxidu zinečnatého.

Výsledky toxicity predikují široké spektrum možného využití nanokompozitních materiálů na bázi oxidu zinečnatého jako antibakteriálního materiálu, neboť navázání na vermikulitovou matici podstatně redukuje toxicitu tohoto materiálu. Do budoucna je předpokladem ověření testů toxicity rovněž na rostlinách, myších a bakteriích. V takovém případě by bylo stanovení toxicity maximálně přesné a komplexní. Bylo by pak snadnější definovat hranici mezi toxickým a antibakteriálním účinkem.

Bakalářská práce byla realizována za finanční podpory projektu SGS č. 2017/45 „Nanostrukturované kompozitní materiály“.

## Literatura

- [1] KING, J.C. TURNLUND, J.. Human Zinc Requirements. In: Mills C, ed. Zinc in Human Biology. *ILSI Human Nutrition Reviews: Springer London*, 1989, 335-50.
- [2] Chapter 16. Zinc: Agriculture and Consumer Protection; 2015 [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: <http://www.fao.org>.
- [3] KLINGSHIRN, C. Zinc oxide: From fundamental properties towards novel applications. *Berlin Springer*. 2010.
- [4] WANG, Z.L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2004, 16(25), R829-R858.
- [5] KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A. JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide From Synthesis to Application: A Review. *Materials*. 2014, 7(4), 2833.
- [6] XIAO, Q. HUANG, S. ZHANG, J. XIAO, Ch. TAN, X. Sonochemical synthesis of ZnO nanosheet. Letter. *Journal of Alloys and Compounds* 459, 2008, L18-L22.
- [7] BISHT, G. RAYAMAJHI, S. ZnO Nanoparticles: A promising Anticancer Agent. *Open access article: Nanomedicine*. 2016, 11.
- [8] VASEEM, M. AHMAD, U. HAHN, Y.-B.Z. ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. *Metal oxide nanostructures and their applications*, Chapter 4. Stevenson Ranch, Calif: American Scientific Publishers, 2010, 1-36. ISBN 1588831701.
- [9] LENG, J. LAN, X. LIU, Y. DU, S. Shape-memory polymers and their composites: Stimulus methods and applications. *Progress in Materials Science*. 2011, 56(7), 1077-1135.
- [10] HUANG, K. MA, H. LIU, J. HUO, S. KUMAR, A. WEI, T. ZHANG, Xu. JIN, S. GAN, Y. WANG, P.C. SHENGTAI, H. ZHANG, Xi. LIANG, X.-J. Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo. *ACS Nano*. 2012, 6(5), 4483-4493.
- [11] TOMAN, M. *Veterinární imunologie*. 2. dopl. a aktualizované vydání Praha: Grada, 2009.
- [12] CHANG, Y.-N. ZHANG, M. XIA, L. ZHANG, J. XING, G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*. 2012, 5(12), 2850-2871.

- [13] MU, Q., DAVID, C.A. GALCERAN, J. REY-CASTRO, C. KRZEMIŃSKI, L. WALLACE, R. BAMIDURO, F. MILNE, S.J. HONDOW, N.S. BRYDSON, R. VIZCAY-BARRENA, G. ROUTLEDGE, MN. JEUKEN, L.J. BOWN, A.P. Systematic Investigation of the Physicochemical Factors That Contribute to the Toxicity of ZnO Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*. 2014, 27(4) 558-567.
- [14] SONG, W. ZANG, J. GUO, J. ZHANG, J. DING, FLI, L. SUN, Z. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2010, 199(3), 389-97.
- [15] LEITNER, J. SEDMIDUBSKÝ, D. Příprava, vlastnosti a využití nanostrukturovaného ZnO. *Chemické listy*. 2016, 110(6), 406-417.
- [16] *Biomarkery oxidačního stresu*. Laboratoř medicínální diagnostiky [online]. Ústav organické technologie VŠCHT Praha [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://pvac.vscht.cz/ustav/vyzkumne-projektystresu>
- [17] Properties of zinc Oxide nanopowder (zno). In: *Hongwu International Group Ltd: HWNANO Materials* [online]. [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.hwnanomaterial.com>
- [18] CHUE, P.W. VALIYAVEETIL, S.. Toxicity studies of Zinc oxide Nanoparticles in Human cells [online]. National University of Singapore. 4 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.nus.edu.sg>
- [19] MESHALKIN Yu. P. and N.P. BGATOVA. Prospects and problems of the use of inorganics nanoparticles in oncology. *J. Siberian Federal Univ. Biology* 2008, 248-268.
- [20] NOHYNEK, G. J. LADEMANN, J. RIBAUD, C. ROBERTS, M. S.. Grey Goo on the Skin? Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety. *Critical Reviews in Toxicology*. 2008, 37(3), 251-277.
- [21] HANLEY, C. LAYNE, J., PUNNOOSE A., REDDY, K.M., COOMBS, I. COOMBS, A. FERIS, K. WINGETT D. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology*. 2008, 19(29), 295103.
- [22] ZHOU, J., XU, N. S. WANG, Z. L.. Dissolving Behavior and Stability of ZnO Wires in Biofluids: A Study on Biodegradability and Biocompatibility of ZnO Nanostructures. *Advanced Materials*. 2006, 18(18), 2432-2435.

- [23] *Katalog produktů* [online]. Hradec Králové: Dent Unit - biodinamica [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.dentunit.cz>
- [24] BRADA, P. *Chemie dentálních cementů: Složení, vlastnosti* [online]. Karlova Univerzita. Praha, s. 38 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://che1.lf1.cuni.cz>
- [25] KOTLOFF, K.L. WINICKOFF, J. IVANOFF, B. CLEMENS, J.D. SWERDLOW, D. SANSONETTI, P. ADAK G. LEVINE, M. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organisation*, 1999, 77(8), 651–666.
- [26] GUTIERREZ, P. G. ROJO, R. Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry: Nanotechnology and Food Industry. *B. Valdez InTech Europe*. Rijeka, 2012, s. 95–128.
- [27] CHAUDHRY, Q. CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*. 2011, 22(11), 595-603 [cit. 2017-05-02].
- [28] KAUR, P. THAKUR, R. KUMAR, S. DILBAGHI, N. Interaction of ZnO nanoparticles with food borne pathogens Escherichia coli DH5 and Staphylococcus aureus 5021 and their bactericidal efficacy, *International Conference on Advances in Condensed and Nano Materials*. AIP Proceedings, 2011, 153.
- [29] NARAYANAN, P. WILSON, W.S. ABRAHAM, A.T. SEVANAN, M.. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against human pathogens. *Bio Nano Science*. 2012, 2(4), 329–335.
- [30] DE AZEREDO, H. M.C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, 30(1), 56-69.
- [31] SOARES, N. DE SÁ SILVA, C. SANTIAGO-SILVA, P. ESPITIA, P.J. GONCALVES, M.J. LOPEZ, M.J. MILTZ, J. CERQUEIRA, M. VICENTE, A. TEIXEIRA, J. SILVA, W. BOTREL, D. Aspects of Milk and Dairy Products: Active and Intelligent Packaging for Milk and Milk Products. *J.A.T. Jane Selia dos Reis Coimbra, Vicente, J. Teixeira*. 2009, 155–174. ISBN: 978-1-4200-9022-2
- [32] FILIPOVÁ, Z., KUKUTSCHOVÁ, J. MAŠLÁŇ, M. *Rizika nanomateriálů*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201-4
- [33] ABBOTT, L. C. MAYNARD, A. D. Exposure Assessment Approaches for Engineered Nanomaterials. *Risk Analysis*. 2010, 30(11), 1634-1644.

- [34] ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, Bohumil BOUZEK, Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- [35] NEL, A. MADLER, L. VELEGOL, D. XIA, T. HOEK, E.M. SOMASUNDARAN, P. KLAESSING, F. CASTRANOVA, V. THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009, 8(7), 543-557.
- [36] GARCIA-GARCIA, E. ANDRIEUX, K. GIL, S. KIM, H.R. LE DOAN, T. DESMAELE, D. D'ANGELO, J. TARAN, F. GEORGIN, D. COUVREUR, P. A methodology to study intracellular distribution of nanoparticles in brain endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, 298(2), 310-314.
- [37] MIN, Y. AKBULUT, M. KRISTIANSEN, K. GOLAN, Y. ISRAELACHVILI, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nat Mater*. 2008, 7(7), 527-538.
- [38] KIM, H.-Y. SOFO, J. O.VELEGOL, D. COLE, M. W. LUCAS, A. A.. Van der Waals Dispersion Forces between Dielectric Nanoclusters. *Langmuir*. 2007, 23(4), 1735-1740.
- [39] HSIAO, I.-L. HUANG, Y.-J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of the Total Environment*. 2011, 409 1219-1228.
- [40] TURNEY, W. DURISKA, M.B. JAYARATNE, V. ELBAZ, A. O'KEEFE, S.J. HASTINGS, A.J. PIVA, T.J. WRIGHT, P.F.A. FELTIS, B.N. Formation of zincontaining nanoparticles from Zn(2)(+) ions in cell culture media: implications for the nanotoxicology of ZnO. *Chem Res Toxicol*. 2012, 25(10), 2057-66.
- [41] KLAINE, S. J. ALVAREZ, P.J.J. BATLEY, G.E. FERNANDES, T.F. HANDY, R.D. LYON, D.Y. MAHENDRA, S. MCLAUGHLIN, M.J.. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. *Environ. Toxicol. Chem*. 2008, 27, 1825.
- [42] SHEN, S.A.J. DE JONGE, M.D. TURNEY, T.W. WRIGHT, P.F. FELTIS, B.N.. Relating cytotoxicity, zinc ions, an reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicol Sci*. 2013, 136(1), 120-30.
- [43] CASEY, I.R. GRINSTEIN, S. ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010, 11(1), 50-61.



- [44] MANKE, A. WANG, L. ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*. 2013, 15.
- [45] GYU-CHUL, Y. WANG, CH. PARK, W.I. ZnO nanorods: synthesis, characterization and applications. *Semiconductor Science and Technology*. 2005, 20(4), 22.
- [46] KIM, Y.-J. YU, M. PARK H-O. YANG, S. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by silica nanomaterials in human neuronal cell line. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2010, 6(4), 336-43.
- [47] RASMUSSEN, J.W. MARTINEZ, E. LOUKA, P. WINGETT, DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010, 7(9), 1063-77.
- [48] HEINLAAN, M. IVASK, A. BLINOVA, I. DUBOURGUIER, H.-Ch. KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 2008, 71(7), 1308-1316.
- [49] LIN, D. XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut*. 2007, 150, 243–250.
- [50] FRANKLIN, N.M. ROGERS, N.J. APTE, S.C. BATLEY, G.E. GADD, G.E. CASEY, P.S. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environ. Sci. Technol*. 2007, 41, 8484–8490.
- [51] XIONG, D. FANG, T. YU, L. SIMA, X. ZHU, W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ*. 2011, 409, 1444–1452.
- [52] CROSS, S.E. INNES, B. ROBERTS, M.S. TSUZUKI, T. ROBERTSON, T.A. MCCORMICK, P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: *In-vitro* assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol. Physiol*. 2007, 20, 148–154.
- [53] ZHENG, Y. LI, R. WANG, Y. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of ZnO nanoparticles. *Int. J. Mod. Phys. B* 2009, 23, 1566–1571.
- [54] WANG, B. FENG, W. WANG, M. WANG, T. GU, Y. ZHU, M. OUYANG, H. SHI, J. ZHANG, F. ZHAO, Y. CHAI, Z. WANG, H. WANG J.. Acute

- toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J. Nanopart.* 2008, 10, 263–276.
- [55] BRUNNER, T.J. WICK, P. MANSER, P. SPOHN, P. GRASS, R.N. LIMBACH, L.K. BRUININK, A. STARK, W.J. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 4374–4381.
- [56] SHARMA, V. SHUKLA, R.K. SAXENA, N. PARMAR, D. DAS, M. DHAWAN, A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. Lett.* 2009, 185, 211–218.
- [57] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-704-4.
- [58] AMBROŠOVÁ, G. *Vliv vysoce nenasycených mastných kyselin a jejich metabolitů na fyziologické funkce profesionálních fagocytů*. Brno, 2008. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 69s. Ústav experimentální biologie
- [59] FRAUKENEROVÁ MATĚJČKOVÁ, J. *Využití elektroforetických a chromatografických metod pro klinický výzkum*. Praha, 2014. Disertační práce. Univerzita Karlova.
- [60] VALÁŠKOVÁ, M. *Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály*. 2., dopl. a opr. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2014. ISBN 978-80-7204-886-1.
- [61] HOLEŠOVÁ, S. ŠTEMBÍREK, J. BARTOŠOVÁ, L. PRAŽANOVÁ, G. VALÁŠKOVÁ, M. SAMLÍKOVÁ, M. PAZDZIORA, E. Antibacterial efficiency of vermiculite/chlorhexidine nanocomposites and results of the in vivo test of harmlessness of vermiculite. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, 42, 466–473.
- [62] WIECZOREK-CUIROWA, K. GRAMRAT, K. Some aspects of mechanochemical reactions. *Materials Science - Poland* [online]. 2006, 27(1), 14 [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: [http://www.materialsscience.pwr.wroc.pl/bi/vol25no1/articles/ms\\_2006\\_037.pdf](http://www.materialsscience.pwr.wroc.pl/bi/vol25no1/articles/ms_2006_037.pdf)
- [63] AGHABABAZADEH, R. MAZINANI, B. MIRHABIBI, A. TAMIZIFAR, M. ZnO Nanoparticles Synthesised by mechanochemical processing. *Journal of Physics: Conference Series*. 2006, 26, 312–314.

- [64] AO, W. LI, J. YANG, H. ZENG, X. MA, X. Mechanochemical synthesis of zinc oxide nanocrystalline. *Powder Technology* . 2006, 168(3), 148-151.
- [65] KRATOCHVÍL, Bohumil, Michal HUŠÁK, Jiří BRYNDA a Juraj SEDLÁČEK. Co nabízí současná rtg strukturní analýza? *Chemické listy*. 2008, 102(889-901), 13.
- [66] ČECH BARABASZOVÁ, K. MAMULOVÁ KUTLÁKOVÁ, K. RITZ, M. HOLEŠOVÁ, S. SIMHA MARTYNKOVÁ, G. Vybrané instrumentální metody analýzy materiálů a nanomateriálů. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-810-6.
- [67] HUŠÁK, M. ROHLÍČEK, J. ČEJKA J. KRATOCHVÍL, B. Řešení krystalové struktury z rtg práškových difrakčních dat - nesplnitelný sen nebo každodenní praxe? *Chemické listy*. Praha, 2007, 101(697-705), 9.
- [68] KAWANO, M. TOMITA, K. Dehydration and redhydration of saponite and vermiculite. *Clays and Clay Minerals*. Japan, 1991, 39(2), 174-183.
- [69] MARCOS, C. ARANGO, Y. RODRIGUEZ, I. X-ray diffraction studies of the thermal behaviour of commercial vermiculites. *Applied Clay Science*. 2009, 42(3-4), 368-378
- [70] CAIS, J. *Elektronová mikroskopie. Metalografie: Metodická příručka*. Praha: Centrum pro studium vysokého školství, 2015. ISBN 978-80-86302-67-6.
- [71] KOSÍKOVÁ, J. *Laserová difrakce pro měření velikosti částic*. SUPMAT, 11. Dostupné z doi: CZ.1.07/2.3.00/20.0111.
- [72] ŠIMEK, M. GÜNWALDOVÁ, V. KRATOCHVÍL, B. Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení. *Chemické listy*. 2014, 50-55(108), 6.
- [73] CORAZZARI, I. DEORSOLA, F.A. GULINO, G. ALDIERI, E. BENSAD, S. TURCI, F. FINO, D. Hazard assessment of W and Mo sulphide nanomaterials for automotive use. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014, 16(5).
- [74] KLOUDA, P. Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. ISBN 80-902155-0-5.
- [75] NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. RYCHLOVSKÝ, P. Spektrometrické analytické metody. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
- [76] PERKAMPUS, H. *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Berlin: Springer, 1992. ISBN 978-3-642-77479-9.